

**Efeito nematodocida da urtiga-maior e da urtiga-menor
sobre o nemátode-da-madeira-do-pinheiro
(*Bursaphelenchus xylophilus*)**

Patrícia Maria da Silva Vieira

Relatório de estágio Profissionalizante para obtenção do Grau de
Mestre em Agricultura Biológica

Júri:

Presidente: Professora Doutora Maria Antónia Pereira da Conceição, ESAC- IPC

Arguente: Doutora Sofia dos Santos Rocha Costa, Pós-Doc no CEF, FCT- UC

Orientador: Professora Doutora Cristina Isabel Cabral Galhano, Professora Adjunta IPC-
ESAC

Coimbra, 2013

Aos meus Avós, Pais e Irmãos

“Grandes coisas não se fazem por impulso,
mas pela junção de uma série de pequenas coisas”

(Van Gogh)

Agradecimentos

O ser humano como ser social que é, muitas vezes é influenciado por aquilo que o rodeia, indo buscar força para superar os desafios que a vida lhe coloca, nas pessoas que lhe estão mais próximas...

Quero agradecer à minha orientadora, Doutora Cristina Isabel Cabral Galhano, por todo o apoio, compreensão, paciência e ajuda que me deu ao longo de todo o tempo de estágio.

Ao Laboratório de Nematologia do Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, pela disponibilização das culturas de fungo, *Botrytis cinerea* e de nemátode, *Bursaphelenchus xylophilus*.

Ao Eng^o Filipe Melo, à Eng^a Neuza e ao Eng^o Heleno, por toda a compreensão e disponibilidade. À dona Helena Marques, à dona Rosa Barreto e ao Sr. Fernando Couceiro, funcionários do Laboratório do Núcleo de Ensino da ESAC, por toda ajuda, apoio, paciência e disponibilidade prestada ao longo de todo o tempo de estágio. Ao Sr. Jorge Viegas, pela ajuda, disponibilidade e paciência no tratamento dos extratos de urtiga.

À minha gerente, Sueli Silva, por toda a compreensão, assim como a todos os meus colegas de trabalho, que de uma forma ou de outra me ajudaram a tornar esta meta possível. Em especial ao Filipe Sardo, meu colega e amigo, por todas as palavras de força e ânimo, pela paciência e pelo apoio que me deu desde o dia em que o conheci, Obrigada!

A toda a coordenação do Mestrado em Agricultura Biológica, Prof. Doutora M^a Antónia Conceição e Prof. Mestre Elsa Canavarro, pela disponibilidade e atenção, assim como a todos os meus colegas de Mestrado.

À Marta Costa e ao Filipe Martins, por toda a ajuda em laboratório, por todo o apoio e força que me deram ao longo de todo o meu percurso académico. Por todas as noites de estudo e trabalhos, em que o nervosismo por vezes falava mais alto, por todos os momentos de divertimento, alegria e descontração que passamos juntos, e que me mostraram que a “esperança é a última a morrer!” e que “unidos somos mais fortes”, Obrigada!

À Marli Lopes e à Sílvia Lemos, que comigo e junto a mim sempre estiveram durante o meu percurso académico e que nunca me deixaram desanimar, Obrigada!

À Edite Martins, ao Carlos Gonçalves e à Sara Gama Pereira por todo o carinho, atenção, força e ânimo que me deram desde o dia que os conheci. Por todos os momentos de tensão e angústia que muitas vezes eram aliviados com sorrisos, gargalhadas e um “docinho”, por todas as palavras carinhosas e de esperança que me fizeram manter a cabeça erguida, Obrigada!

Ao meu Professor e amigo, Helder Marto, por todas as palavras de ânimo, ajuda e força que me deu e que me fizeram olhar para o caminho da vida de forma diferente, de cabeça erguida e sem medo, Obrigada!

Ao Bruno Pinheiro por tudo! Por estar ao meu lado nas horas de angústia e desespero, por ter sempre uma palavra de conforto, esperança e otimismo. Por me mostrar o lado bom da vida, nas coisas mais simples e delicadas. Por me mostrar que as coisas más também têm um lado bom...que tudo o que nos acontece na vida, todos os bons e maus momentos são como tijolos de uma casa...que um a um, a casa vai-se erguendo, Muito Obrigada! À sua família, pelo acolhimento, atenção e carinho que me deram desde o primeiro dia...pelas coisas boas que me fizeram sentir e pelas coisas boas que me fizeram viver, Obrigada!

Como diz o ditado, os últimos são sempre os primeiros...como não podia deixar de ser, o meu maior agradecimento vai para os meus avós, para os meus pais e irmãos, que sem eles não estaria aqui.

Aos meus avós, por me terem levado tantas vezes para o campo e me terem transmitido tantos conhecimentos, que me faziam e fazem olhar para um terreno e, não ver apenas um pedaço de terra no meio tantos, mas sim um sítio onde posso ter um “pequeno mundo”, Obrigada!

Aos meus pais, para os quais todos os agradecimentos serão sempre poucos! Por todo o apoio, força, carinho, ajuda, atenção, compreensão...pela minha vida! Sem eles não seria a pessoa que sou hoje, Muito Obrigada!

Aos meus irmãos, por me questionarem por tudo e mais alguma coisa, despertando em mim a vontade de adquirir mais conhecimento, Muito Obrigada!

Aos que por lapso que esqueci de referir, fica também o meu mais sincero agradecimento, sem vocês não teria chegado até aqui, Obrigada!

A todos o meu MUITO OBRIGADA!

RESUMO

O nemátode-da-madeira-do-pinheiro (NMP), *Bursaphelenchus xylophilus*, é um fitoparasita, com elevado potencial destrutivo de coníferas, a nível mundial, sendo considerado organismo de quarentena. É originário da América do Norte. Foi detetado em Portugal, e pela primeira vez na Europa, em 1999, na Península de Setúbal. As entidades oficiais desenvolveram de imediato medidas de erradicação e controlo do nemátode. Foram impostas restrições ao transporte e comercialização da madeira e subprodutos, de Portugal para outros países. Pelas suas características biológicas, o NMP é um organismo de difícil controlo, sendo urgente encontrar um método que o detenha. O objetivo deste trabalho foi estudar o potencial nematodocida de extratos de urtiga-maior e urtiga-menor em relação ao NMP. Foram realizadas experiências *in vitro*, testando extratos frescos e frescos que foram armazenados, de urtiga. Foram feitas cinco repetições para cada extrato e para a testemunha. O efeito dos extratos sobre o nemátode foi observado às 12, 24, 48, 72, 96 e 168 horas após o início da experiência.

Com base nos resultados obtidos, os extratos frescos têm um efeito nematostático superior aos extratos frescos armazenados. O extrato de *Urtica urens* é o que tem efeito nematostático mais rápido e duradouro, podendo ser bastante vantajoso.

Palavras chave:

Bursaphelenchus xylophilus, extratos frescos armazenados, extratos frescos, nemátode-da-madeira-do-pinheiro, urtiga-maior (*Urtica dioica*), urtiga-menor (*Urtica urens*).

ABSTRACT

The pine wood nematode (PWN), *Bursaphelenchus xylophilus*, is a phytoparasite with a great destructive potential of conifers, worldwide, considered a quarantine organism. It originates from North America. Was detected in Portugal, and for the first time in Europe in 1999, in the Setúbal Peninsula. The officials immediately developed measures to eradication and control the nematode. Restrictions were imposed on the transport and marketing of wood and byproducts, from Portugal to other countries. By their biological characteristics, the NMP is an organism difficult to control, so it's urgent to find a method that holds. The aim of this work was to test the nematicidal potential extracts greater nettle (*Urtica dioica*) and lower nettle (*Urtica urens*) for PWN. Tests were conducted *in vitro*, in extracts that were tested fresh and fresh stored extracts. Five replications were used for each extract and witness. The effect of the extracts on nematode was observed at 12, 24, 48, 72, 96 and 168 hours of exposure.

Based on the results, the fresh nettle extracts have an effect nematostatic than the fresh stored extracts. The extract of *Urtica urens* is what has nematostatic effect more rapid and enduring and may be advantageous.

Keywords:

Bursaphelenchus xylophilus, fermented extracts, fresh extracts, greater nettle (*Urtica dioica*), lower nettle (*Urtica urens*), pine wood nematode

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJECTIVOS	15
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	16
3.1. O Nemátode-da-Madeira-do-Pinheiro: um problema emergente.....	16
3.2. Controlo do nemátode-da-madeira-do-pinheiro	24
4. METODOLOGIAS	33
4.1. Obtenção, manutenção e propagação da cultura de <i>Botrytis cinerea</i> e de <i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	33
4.2. Preparação dos extratos de urtiga-maior e de urtiga-menor	34
4.3. Efeito dos extratos sobre o Nemátode-da-Madeira-do-Pinheiro.....	37
5. RESULTADOS.....	39
5.1. Efeito dos extratos de urtiga na mobilidade do nemátode-da-madeira-do-pinheiro, <i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	39
6. DISCUSSÃO	44
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
Bibliografia.....	48
Anexo I.....	59
Anexo II.....	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Distribuição de pinheiro bravo (<i>Pinus pinaster</i>) em Portugal continental	17
Figura 2- Nemátode-da-madeira-do-pinheiro, <i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	20
Figura 3- Longicórnio-do-pinheiro, <i>Monochamus galloprovincialis</i>	20
Figura 4- Ciclo de vida do nemátode-da-madeira-do-pinheiro, <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> .	21
Figura 5- Ciclo de vida do nemátode-da-madeira-do-pinheiro, <i>Bursaphelenchus xylophilus</i> .	21
Figura 6- Primeiros sintomas do NMP.....	22
Figura 7- Fases do ciclo de vida do nemátode-da-madeira-do-pinheiro	23
Figura 8- Urtiga maior (<i>Urtica dioica</i> L.)	30
Figura 9- Urtiga menor (<i>Urtica urens</i> L.)	30
Figura 10- a) Recolha de NMP do meio de cultura para um copo de vidro; b) Distribuição da suspensão de NMP para caixas de Petri de vidro	34
Figura 11- A- Maceração 1:5; B- Maceração 1:10	35
Figura 12-A- Infusão 1:5; B- Infusão 1:10.....	35
Figura 13-Centrífuga ROTANTA 460 R- Hettich Zentrifugen	36
Figura 14-Sistema de filtração com filtro Sartorius	36
Figura 15- Frascos de vidro SCHOTT, envolvidos em papel de alumínio e identificados.....	37
Figura 16- A-Blocos de vidro escavados devidamente organizados dentro da caixa; b) Caixas no escuro.	38
Figura 17- Blocos de vidro escavados com extrato fresco de urtiga-maior armazenado.....	39
Figura 18- Blocos de vidro escavados com extrato fresco de urtiga-maior	40
Figura 19-- Blocos de vidro escavados com extrato fresco de urtiga-menor.....	40
Figura 20- Percentagem de mobilidade de NMP expostos a diferentes extratos de urtiga-maior	43
Figura 21- Percentagem de mobilidade de NMP expostos a diferentes extratos de urtiga-menor.....	43
Figura 22- Efeito do extrato fresco de urtiga-maior armazenado sobre <i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	63
Figura 23-Efeito do extrato fresco de urtiga-maior sobre <i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	63
Figura 24- Efeito do extrato fresco de urtiga-menor sobre <i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Efeito dos extratos na mobilidade de <i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	41
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ESAC-Escola Superior Agrária da Coimbra

IPC- Instituto Politécnico de Coimbra

UC- Universidades de Coimbra

NMP- Nemátode-da-Madeira-do-Pinheiro

ANEFA- Associação Nacional de Empresas Florestais, Agrícolas e do Ambiente

EPPO- European and Mediterranean Plant Protection Organization

ZT- Zona tampão

ZA- Zona afetada

ZR- Zona de restrição

ZI- Zona isenta

FNAPF- Federação Nacional das Associações de Produtores Florestais

VAB- Valor Acrescentado Bruto

Fresco ARM- Fresco Armazenado

M 1:5- Maceração 10g/50mL

M 1:10-Maceração 10g/100mL

I 1:5-Infusão 10g/50mL

I 1:10-Infusão 10g /100mL

%Imb.- Percentagem de imobilidade

% Mt- Percentagem de mortalidade

1. INTRODUÇÃO

O presente relatório foi realizado no âmbito do estágio curricular do Mestrado em Agricultura Biológica, que decorreu no Departamento do Ambiente e no Núcleo de Ensino da Escola Superior Agrária de Coimbra (ESAC).

A floresta representa cerca de 14% do fluxo económico, sendo maioritariamente vindo da exploração de coníferas do género *Pinus* (Mota,2011).

O pinheiro-bravo, *Pinus pinaster*, em termos económicos apresenta uma mais-valia inquestionável, pois é a espécie silvícola com maior peso em Portugal, ocupando 27% da área de floresta, o que significa cerca de 880 000 ha (Silva *et al.*,2007;Vasconcelos *et al.*,2008). No contexto socioeconómico tem um grande peso, visto que 89% das empresas do país envolvem a fileira do pinho, representando mais de 65 000 postos de trabalho diretos. (Sousa, *et al.*,2011). Representa 62% do Volume Acrescentado Bruto (VAB) da Fileira Florestal, que em 2010, atingiu 927 Milhões de euros de exportações (Sousa *et al.*, 2011).

O nemátode-da-madeira-do-pinheiro (NMP) é transmitido, em Portugal, por um inseto vetor, o coleóptero *Monochamus galloprovincialis* e tem devastado significativamente os povoamentos de pinheiro-bravo, causando a doença da murchidão do pinheiro (ANEFA, 2012). Este problema afetou e tem afetado gravemente todo o setor madeireiro da fileira do pinheiro, tendo-se vindo a assistir ao abate massivo de árvores sintomáticas, tornando a matéria-prima escassa. Por outro lado, a legislação apertada aplicada ao transporte e tratamento de madeira serrada e subprodutos, indispensável para que seja possível a dispersão da doença, tornou-se difícil de cumprir por empresas de pequenas dimensões, que foram por isso obrigadas a encerrar, colocando em risco cerca de 10 mil postos de trabalho (Pinto, 2010).

Atualmente, e apesar de todos os esforços envidados pelas autoridades competentes, o NMP encontra-se disperso por todo o país, tendo já sido detetado também em Espanha (ANEFA,2012). Assim, compreende-se a necessidade de encontrar alternativas eficazes para controlar este nemátode, no entanto, que sejam ecologicamente sustentáveis.

Tendo em conta que já é sobejamente conhecido o papel desempenhado pelas plantas como pesticidas naturais, quer através de compostos isolados, quer através de extratos produzidos a partir dos seus órgãos ou de todo o indivíduo, estas, poderão também constituir uma fonte de alternativas no controlo do NMP.

Uma das plantas amplamente utilizada em Agricultura Biológica é a urtiga, que apresenta propriedades preventivas contra insetos, ação fertilizante e estimulante para o solo (Gerbe,2009).No entanto, o seu efeito sobre o NMP é ainda desconhecido.

2. OBJECTIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi estudar o potencial nematodocida de duas espécies de urtiga, urtiga-maior (*Urtica dioica* L.) e urtiga-menor (*Urtica urens* L.) sobre o nemátode-da-madeira-do-pinheiro, *Bursaphelenchus xylophilus*.

3. REVISÃO DA LITERATURA

Os nemátodes, invertebrados pertencentes ao filo Nematoda, existem em quase todos os ambientes, não só como parasita, como também como organismo de vida livre. (Coyne,2007). O grupo dos nemátodes fitoparasitas é considerado, entre os inimigos das culturas, o que mais prejuízos causa e de mais difícil controlo (Bird *et al.*, 2009 *in* Andrés, 2012).

O diagnóstico de problemas causados por nemátodes fitoparasitas torna-se por vezes difícil de realizar tendo em conta que os sintomas são coincidentes com os de outras causas, que aparentam ser mais óbvias ou mais prováveis, como por exemplo o clima, disponibilidade em água, condições do solo ou a presença de outras doenças e pragas. Na realidade, muitas vezes existe a combinação de vários fatores que reduzem a produção, tais como densidade populacional de nemátodes, virulência da espécie e da resistência ou tolerância da planta hospedeira ao ataque do nemátode, sendo necessário quantificar todos esses fatores (Coyne,2007).

De entre os nemátodes fitoparasitas, os do género *Bursaphelenchus*, apresentam uma relação de simbiose com alguns insetos, os vetores, que lhes permitem propagar-se de forma eficiente. O nemátode *Bursaphelenchus xylophilus*, cujo vetor, em Portugal é o coleóptero *Monochamus galloprovincialis*, é um organismo com cerca de 800µm de comprimento e 22µm de diâmetro, que se desenvolve e reproduz-se muito rapidamente, conseguindo completar o seu ciclo de vida em quatro dias (Agrios, 2005)

3.1. O Nemátode-da-Madeira-do-Pinheiro: um problema emergente

A doença da murchidão dos pinheiros é causada por um nemátode fitoparasita, o nemátode-da-madeira-do-pinheiro (NMP), *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner & Bühner,1934) Nickel 1970, um dos organismos com maior potencial destrutivo de coníferas, a nível mundial, verificando-se que as árvores infetadas por NMP acabam por morrer (ANON.1, s.d., Dec.lei nº95/2011; Mota e Vieira, 2008 *in* Barbosa, 2010) Segundo a Associação Nacional de Empresas Florestais, Agrícolas e do Ambiente (ANEFA,2012) o NMP é considerado um organismo com grande potencial destrutivo para a floresta de coníferas, particularmente para as do género *Pinus*. O género *Pinus* engloba as espécies com

maior expressão territorial na floresta Portuguesa, cerca de 880 000 ha, como se pode verificar na Figura 1, dando suporte a uma fileira importante para a economia nacional. (Silva *et al.*, 2007; Vasconcelos *et al.*, 2008)



Figura 1- Distribuição de pinheiro bravo (*Pinus pinaster*) em Portugal continental

<http://centropinus.org/img/publicacoes/1/manual02.pdf>

No ano de 2010, surgiu a notícia de que, dos 790 mil hectares de pinhal existentes em Portugal, aproximadamente 380 mil estavam infetados com *B. xylophilus*, o que obrigou ao corte de cerca de 200 mil hectares de pinhal. Este alerta foi deixado pelo presidente da AIMMP, Associação das Indústria de Madeira e Mobiliário de Portugal, que admitiu estarem em causa cerca de 10 mil postos de trabalho (Pinto, 2010).

Os primeiros casos da doença em pinheiros foram registados no Japão, no início do século XX. Alvitrou-se que a sua disseminação tivesse ocorrido desde o Norte da América para a ilha japonesa de Kyushu, através de madeira infetada (Nickel *et al.*, 1981; Mamiya, 1983; Malek & Appleby, 1984). O facto das coníferas americanas apresentarem maior resistência ao NMP do que as japonesas vem apoiar a ideia de que a dispersão do nemátode terá ocorrido desde a América do Norte para o Japão e daí para os outros países (Li *et al.*, 1983 *in* EPPO, s.d.). Atualmente encontra-se também na China, Coreia do Sul, Taiwan e Portugal, tendo sido recentemente detetado em Espanha (Barbosa *et al.*, 2010; Abelleira *et al.*

2011; Robertson *et al.* 2011; ANEFA,2012). A propagação da doença ocorreu devido ao comércio internacional, onde havia livre circulação de madeira e subprodutos não tratados e à suscetibilidade das coníferas (Vicente *et al*, 2012)

Nos anos 1997 e 1998, com a passagem de Macau para a administração chinesa e com a realização da Expo 98, houve um maior afluxo de madeira processada em Portugal. Estudos realizados posteriormente revelaram que essa madeira estava infetada com *B. xylophilus* e que existia uma grande proximidade genética entre as populações portuguesas e as do Extremo Oriente (Metge & Burgermeister, 2005). Apesar da existência de uma infinidade de pragas e doenças no ecossistema florestal, também existe um equilíbrio ecológico que permite a manutenção, sustentabilidade e ecologia dos povoamentos florestais (Vasconcelos *et al*, 2008). Com a introdução desta ameaça e com a ausência de resistências por parte das coníferas afetadas (Ryss *et al*,2008; Sousa *et al*,2011), verificou-se o alastramento da doença da murchidão dos pinheiros, o que provocou uma redução drástica na espécie, aproximadamente 28% o que corresponde a 159 707 ha (DRAPC,2007)

Foi detetado em Portugal, e pela primeira vez na Europa, em 1999, na Península de Setúbal, sendo mais tarde, em 2008, encontrado na zona Centro do País, em Arganil e Lousã. Posteriormente, foram recolhidas amostras positivas nas regiões de Leiria e de Aveiro. (ANEFA,2012) Em 2009 foi detetado na Madeira, numa das prospeções realizadas ao território, desde 2000. Estas prospeções tinham como objetivo fazer o despiste da presença do NMP na Região Autónoma da Madeira. (DRFCN,2013)

Aquando da deteção do NMP em Portugal, em 1999, as entidades oficiais desenvolveram de imediato medidas de erradicação e controlo como parte do Programa Nacional de Luta Contra o Nemátode do Pinheiro (PROLUNP) (ANÓN.1).

Foi criado um quadro legislativo específico de modo a assegurar o enquadramento legal das medidas de controlo fitossanitário necessárias. Assim sendo, o território nacional foi dividido em 4 zonas. As zonas afetadas (ZA) onde já tinha sido detetada a presença do NMP; as zonas tampão (ZT) que são as áreas do território nacional que circundam a ZA em toda a sua extensão com uma largura, que inicialmente foi estabelecida com 20km; as zonas de restrição (ZR), que são as áreas que correspondem à totalidade da ZA e da ZT e as zonas isentas (ZI) que são as áreas do território nacional que não é identificada como de ZR (Forestis, s.d.).

Foram abatidos pinheiros-bravos, assim como outros hospedeiros do inseto vetor, *Monochamus galloprovincialis* (Portaria nº103/2006; Portaria nº815/2006). Contudo, as medidas adotadas não evitaram a dispersão do nemátode. Em junho de 2008, foi detetado em áreas fora da zona previamente demarcada, o que levou a que todo o país tivesse sido declarado como “área afetada”. Este facto conduziu à imposição de restrições ao transporte e comercialização da madeira e subprodutos, de Portugal, para outros países, tendo estas medidas acarretado sérias implicações para a indústria madeireira. Este organismo tem sido responsável por fortes limitações ao comércio internacional de madeira, sendo considerado organismo de quarentena pela Organização Europeia e Mediterrânica de Proteção de Plantas (EPPO, s.d., Commission Decision 2008/684/EC; Portaria nº553/B/2008)

A atividade humana é um fator importante para a dispersão da doença, através da circulação de material lenhoso infetado, razão que leva a fortes limitações ao comércio internacional de madeira e ser classificado como organismo prejudicial para a União Europeia. Assim sendo, encontram-se definidas medidas e ações que, por imperativos fitossanitários mas também legais, decorrentes de várias decisões comunitárias e igualmente estabelecidas no Decreto-Lei nº95/2011, de 8 de Agosto, retificado pela Declaração de Retificação nº 30A/2011, de 7 de Outubro, têm que ser obrigatoriamente aplicadas no controlo do Nemátode da Madeira do Pinheiro (NMP) e do seu vetor, de modo a evitar a dispersão da doença e, quando possível, permitir a sua erradicação (ANEFA, 2012).

Segundo Vasco Campos, presidente da Federação Nacional das Associações de Produtores Florestais (FNAPF), numa entrevista, refere que existem várias razões para a rápida progressão do NMP. As áreas afetadas pelo nemátode, são áreas de grande extensão de povoamentos de pinheiro-bravo (*Pinus pinaster*) em Portugal. Essas áreas, na sua grande maioria são monoculturas, ou seja, não existem barreiras físicas que travem o avanço do nemátode. O abandono florestal, ou seja, árvores doentes acabam por ficar muito tempo no terreno sem serem removidas e eliminadas, o que permite a contaminação das que estão em volta (Clara, 2011).

A doença da murchidão dos pinheiros envolve três organismos: uma gimnospérmica como hospedeiro, normalmente uma conífera do género *Pinus*, o NMP (Fig.2) e um vetor, que no caso da doença da murchidão dos pinheiros, em Portugal é o longicórnio-do-pinheiro, *Monochamus galloprovincialis* (Fig.3) (Giblin-Davis,1993)



Figura 2- Nemátode-da-madeira-do-pinheiro, *Bursaphelenchus xylophilus*



Figura 3- Longicórnio-do-pinheiro, *Monochamus galloprovincialis*
(Adaptado de: Canyelles,s.d.)

O ciclo de vida do NMP é relativamente complexo, podendo dividir-se em duas fases: a fase propagativa e a fase dispersiva (Fig.4). A primeira fase, onde se verifica a rápida multiplicação da população de nemátodes, ocorre no xilema e compreende seis fases: o ovo, quatro estádios juvenis (J_1, J_2, J_3, J_4) e a fase adulta. Em condições ótimas de temperatura (entre 9,5°C e 33°C) e humidade, assim como de quantidade de nutrientes, o ciclo de vida (Fig.5) pode ocorrer em apenas 4 ou 5 dias. É durante esta fase, que se tornam visíveis os primeiros sintomas na árvore (Agrio,2005; Bidarra, 2008; EPPO,s.d)

À semelhança da maior parte dos nemátodes, o primeiro estágio juvenil (J_1) é observado dentro do ovo, onde sofre a primeira muda, dando origem ao segundo estágio juvenil (J_2). É nesta fase que o nemátode eclode. Após a segunda muda, surge o terceiro estágio (J_3). Contudo, neste estágio, existem duas formas: uma que sofre muda e origina o quarto estágio juvenil (J_4) e que, após a quarta muda, se transforma em adulto e que permanece na árvore infetada; uma outra forma, que se trata de um estágio de dispersão que

não se alimenta (J_{III}). Nesta fase o nemátode agrega-se à parede da câmara pupal do inseto vetor, no xilema, e após a terceira muda transforma-se num jovem de quarto estágio (J_{IV}), *dauer* que não se alimenta. A *dauer*, forma especializada de sobrevivência durante a fase de transporte, entra para o sistema respiratório dos jovens adultos do inseto vetor que a transportam para novas árvores. Quarenta e oito horas após a transmissão para o novo hospedeiro, a *dauer* sofre uma muda transformando-se em adulto. A mudança para a fase dispersiva ocorre normalmente após a morte da árvore e apenas na presença de pupas do vetor no interior da madeira (Bidarra, 2008; Carm *et al.*, s.d.)

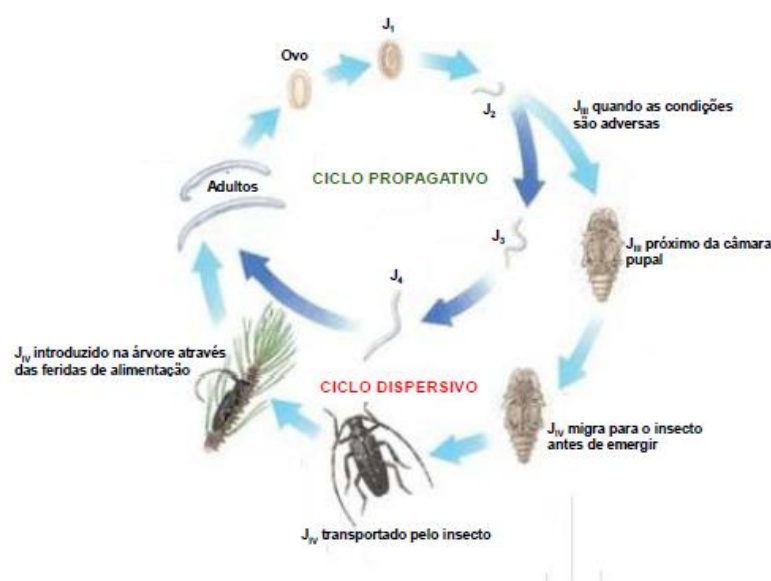


Figura 4- Ciclo de vida do nemátode-da-madeira-do-pinheiro, *Bursaphelenchus xylophilus*
(Adaptado de: Abrantes, 2009)

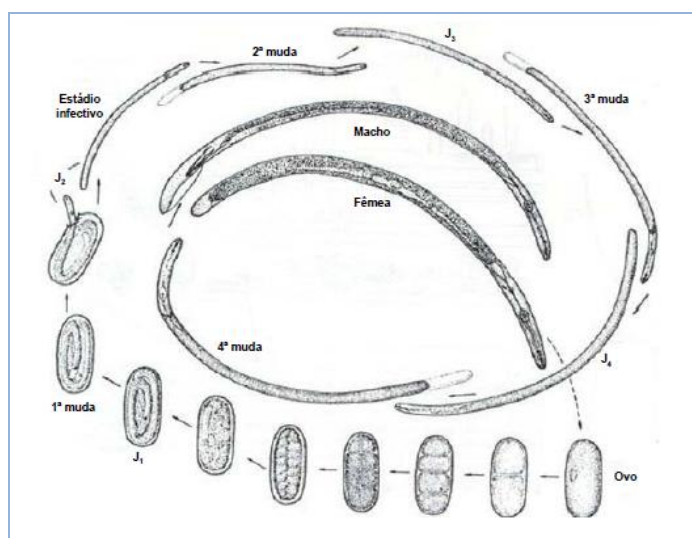


Figura 5- Ciclo de vida do nemátode-da-madeira-do-pinheiro, *Bursaphelenchus xylophilus*
(Adaptado de: Abrantes, 2009)

Nas galerias que o vetor fez na madeira, desenvolvem-se fungos impregnados de nemátodes. Quando o vetor ainda imaturo inicia o voo, leva consigo uma grande quantidade de nemátodes. Esta forma de transmissão só ocorre em determinadas espécies de *Pinus*. Este facto ainda não está totalmente explicado, colocando-se a hipótese de acontecer devido a algumas árvores desenvolverem resistências físicas e bioquímicas, que possam prevenir a invasão direta dos tecidos sãos (EPPO, s.d.)

O NMP, quando entra na árvore, multiplica-se nos canais de resina e ataca as células epiteliais. Cerca de três semanas mais tarde, as árvores começam a mostrar os primeiros sintomas de “decadência”, reduzindo-se assim a produção e exsudação de resina. As consequências desta redução são várias, tais como, redução dos mecanismos de defesa, atração de insetos adultos para acasalamento e intensificação da coloração amarelada e murchidão das árvores. Aproximadamente 30-40 dias depois da infeção, a árvore morre, contendo milhões de nemátodes por todo o tronco, ramos e raízes. O restante ciclo é semelhante ao que já foi descrito com a transmissão durante a oviposição, em que o nemátode se localiza junto da pupa do inseto vetor pouco antes da sua eclosão (EPPO, s.d.)

Relativamente à morfologia, o NMP apresenta as características gerais do género, ou seja lábios grandes, estilete pouco desenvolvido com reduzidos bolbos basais; bolbo médio esofágico bem desenvolvido glândula esofágica aberta, dentro do bolbo médio. Nas fêmeas, o saco uterino é longo. Nos machos, a cauda é curvada ventralmente, com uma pequena bursa. As espículas são achatadas numa estrutura semelhante a um disco- cucullus- na extremidade distal (EPPO, s.d.)

Existem três características que o distinguem: no macho, a espícula é achatada; na fêmea, o lábio anterior da vulva tem pregas “flap” e a cauda é arredondada.



Figura 6- Primeiros sintomas do NMP
(Adaptado de: cafonpera.blogspot.com)

O primeiro sintoma externo é o amarelecimento e emurchecimento das agulhas (Fig.6), ocorrendo, eventualmente, a morte da planta. No interior da planta, a primeira indicação da presença do nemátode é a diminuição da produção de resina. A transpiração das folhas é reduzida (Mamiya, 1983 *in* EPPO, s.d.) (EPPO,s.d.). O emurchecimento pode aparecer inicialmente num ramo apenas, embora toda a árvore venha mais tarde a

manifestar também sintomas (Malek & Appleby, 1984 *in* EPPO, s.d.) (EPPO, s.d.). Muitas vezes, os sintomas podem resultar da alimentação do inseto nos rebentos mais jovens.

O género *Monochamus*, em coníferas, é o principal vetor de *B. xylophilus*. Em Portugal, como já referido anteriormente, o vetor do NMP é a espécie *M. galloprovincialis* (EPPO, s.d.)

A oviposição ocorre em cicatrizes da casca das árvores (Fig.7), e as larvas eclodem após 4-12 dias, dependendo da temperatura. O primeiro instar da larva começa a alimentar-se do floema e do câmbio da zona sub-cortical. No terceiro instar, a larva alimenta-se da seiva e forma galerias em forma de “S”, perpendiculares aos eixos e paralelos aos eixos. Mais tarde, o instar seguinte completa as galerias formando a câmara pupal. O último instar larvar fecha as aberturas da galeria e inicia o estado de pupa. Após cerca de 19 dias, os adultos eclodem, começando a deslocar-se no xilema até atingirem a superfície. Entre a eclosão e a emergência pode haver um período de 6-8 dias. Em alguns dos estádios descritos, exceto o de pupa, pode ocorrer uma hibernação. Quando não existe hibernação, o ciclo de vida, desde a oviposição à emergência do adulto, pode ocorrer em 8-12 semanas (EPPO, s.d.).

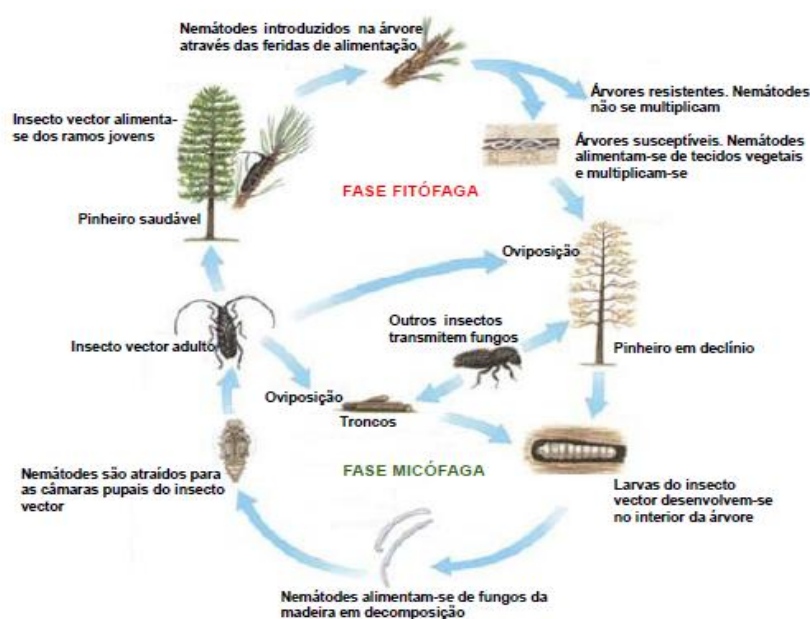


Figura 7- Fases do ciclo de vida do nemátode-da-madeira-do-pinheiro
(Adaptado de: Abrantes, 2009)

A larva é apoda apresentando corpo alongado, com 10 segmentos abdominais, a diferença de comprimento e largura da cabeça é bem visível. Os tergitos são simples e sem espículas, nem placas esclerificadas (EPPO, s.d.).

Os adultos podem medir de 10-30 cm. Algumas das características do género são, saliências antenais longas, próximas e separadas por uma cavidade profunda, a fronte pode ser transversal ou sub-angulosa. As antenas são delgadas, no macho são muito longas, na fêmea são distintamente mais compridas que o corpo; o terceiro segmento pode ser três vezes o comprimento do escapo. Em ambos os sexos as patas são alongadas e finas, nos machos a tíbia anterior é arqueada e o tarso coberto de pêlos.

Estes insetos apenas fazem oviposição em árvores mortas ou em stress. A larva, ao alimentar-se, faz galerias e fura a madeira sob a casca, tornando a árvores mais vulnerável.

3.2. Controlo do nemátode-da-madeira-do-pinheiro

Inicialmente o controlo do NMP foi feito através da fumigação das árvores infetadas com NMP com metam-sódio, pela aplicação por via aérea de pesticidas sistémicos contra o inseto vetor, ou através da injeção nos trancos de nematodocida como tartrato de morantel ou benzoato de emamectina (Kishi, 1995; Korea Forest Service, 2003; Lee *et al.*, 2003 *in* Park, 2007; Takai *et al.*, 2003 *in* Barbosa, 2010). Algumas questões foram levantadas com o uso deste tipo de pesticidas sintéticos, em relação à saúde ambiental e humana. Por isso, há necessidade de desenvolver métodos alternativos de controlo menos tóxicos (Noling and Becker, 1994 *in* Choi, 2007). Os fitoquímicos podem trazer imensos benefícios, podendo ser usados como nematodocida ou estes compostos serem modelo para o desenvolvimento de produtos mais amigos do ambiente (Chitwood, 2002; Park *et al.*, 2005 *in* Choi, 2007). Estes fitoquímicos são agentes de controlo adequados para a gestão integrada de inimigos das plantas, porque são seletivos, têm pouca ou nenhuma ação danosa contra os organismos não-alvo ou para o meio ambiente, podendo ser aplicados diretamente na planta e no solo (Arnason *et al.*, 1989; Hedin e Hollingworth, 1997).

A eliminação do inseto vetor foi também uma medida adotada para controlar o NMP (Ogawa, 1988 *in* Whitehead, 1998). Quando foram detetados os primeiros casos, o controlo do vetor foi feito através da aplicação de inseticidas e da remoção de árvores que estavam a morrer ou já estavam mortas (EPPO, s.d.).

Muitos estudos têm sido realizados procurando meios alternativos de controlo, tais como controlo biológico, tanto do nemátode como do vetor, atrativos de insetos, criação de clones resistentes de *Pinus* e indução de resistências através da inoculação de isolados de *B. xylophilus* não patogénicos (EPPO, s.d.).

O tratamento térmico da madeira para exportação é também uma forma de evitar a disseminação da doença e pensa-se ser eficaz. A madeira tem que ser sujeita a uma temperatura de 56°C durante, pelo menos, 30 minutos (EPPO, s.d.).

Recentemente, foram apresentadas algumas soluções em termos de transporte e armazenamento de madeira de coníferas hospedeiras do nemátode, pela empresa Florgénese, que apresenta os produtos STORANET (rede inseticida) e Clotianidina (inseticida) (ANEFA,2012). Estes dois produtos, têm como objetivo tapar todo o material lenhoso durante o transporte. No entanto, sabe-se que Clotianidina é uma substância muito tóxica para os organismos aquáticos, por isso deve-se ter o cuidado de não o aplicar em terrenos com águas superficiais (ANÓN.4, s.d.).

Como foi referido anteriormente, tem-se verificado uma crescente preocupação na procura de alternativas aos pesticidas químicos de síntese, tendo em conta os sobejamente conhecidos problemas ambientais que podem advir da sua utilização. Essa preocupação é mais evidente quando se pretendem controlar inimigos das plantas destinadas à alimentação humana, no entanto, a mesma preocupação deverá estar presente quando se pretende controlar inimigos de plantas florestais. Desde 1972, o ano de fundação de IFOAM, *International Federation of Organic Agriculture Movement*, que se tem discutido mundialmente conceitos, princípios e objetivos da Agricultura Biológica também designada por “agricultura orgânico”, “*organic farming*”, “agricultura ecológica”, “agricultura natural” ou “*nature farming*”. Este modo de agricultura é considerado sustentável ou como uma alternativa à agricultura convencional ou de produção integrada. Este sistema de produção evita ou exclui praticamente a utilização de produtos químicos de síntese mas recorre, entre outras práticas culturais; à luta biológica de modo a controlar inimigos das plantas (Ferreira, 2012a). Um trabalho de investigação baseado em 293 casos em todo o mundo em que se comparou a agricultura biológica com outros modos de produção agroalimentar mostrou que a agricultura biológica pode alimentar todo o planeta sem impacte negativo no ambiente, para além de poder limitar de forma considerável o problema do aquecimento global e das alterações climáticas, devendo esta conclusão ser tida em consideração a novas políticas agrícolas a nível mundial (Badgley *et al.*, 2007)

Apesar da agricultura biológica ser associada a sistemas de produção agroalimentares, isto é, a sistemas agrícolas, deve ter-se presente que o ecossistema florestal e em particular o pinhal de pinheiro-bravo, não está isolado de forma estanque do meio envolvente. Por isso, também aqui se deve evitar o uso de pesticidas de síntese, à semelhança do que deve ser feito

nos sistemas agrícolas, como vem referido no Princípio da Saúde, um dos quatro princípios básicos da agricultura biológica (Ferreira, 2012a). Por outro, o princípio da Ecologia inclui a agricultura biológica dentro dos sistemas ecológicos vivos (Ferreira, 2012a). Nestes também poderão e deverão ser incluídas as florestas. No princípio da Integridade é salientado que a agricultura biológica pretende produzir uma quantidade suficiente de alimentos de qualidade, para além de outros produtos. Estes poderão incluir as próprias árvores assim como produtos que delas podem derivar, entre os quais podem ser destacados os que são utilizados diretamente para transporte de produtos alimentares desde o local de produção até ao consumidor final. O princípio da Produção refere que a agricultura biológica deve ter como preocupação final proteger a saúde e o bem-estar das atuais e futuras gerações assim como do ambiente (Ferreira, 2012a), podendo este último englobar entre outros ecossistemas o florestal.

Quando se analisam os objetivos da agricultura biológica também se verifica a sua potencial preocupação com os ecossistemas florestais, como se inferido nos seguintes objetivos: 2, “interagir de forma construtiva e equilibrada com os sistemas de ciclos naturais”; 3 “promover e desenvolver ciclos biológicos dentro do sistema de produção, envolvendo microrganismos, ... plantas e animais”; 6 “contribuir para a conservação do solo e da água”; 11 “minimizar todas as formas de poluição que possam resultar das práticas agrícolas”; 12 “manter a biodiversidade dos sistemas agrícolas e do meio envolvente, incluindo a proteção dos habitats de animais e plantas selvagens”; 15 “produzir produtos não alimentares com base em recursos renováveis e completamente biodegradáveis (não poluentes)”.

Os fitoquímicos poderão ser apontados como potenciais alternativas de proteção de plantas, quer devido às suas próprias características, quer servindo como compostos modelo para o desenvolvimento de químicos de síntese com atividade potenciada e amigos do ambiente (Chitwood, 2002; Park *et al.*, 2005). Poderão funcionar como biopesticidas, que está definido como sendo um pesticida de origem biológica, é um produto que contém um microrganismo como substância ativa ou que se extrai de um ser vivo mediante processos que não alteram a sua composição química. O biopesticida pode ser constituído por parte ou por toda a substância ativa, ser concentrada ou não, e ser adicionada ou não a substâncias adjuvantes. Os produtos naturais criam um dos meios alternativos de proteção de culturas, que vão ao encontro de alguns nichos de mercado (Roger, 2002).

A revolução verde veio introduzir o uso de pesticidas de síntese química no controlo de todo o tipo de praga e doença. Estes pesticidas apesar de serem de efeito imediato, tiveram efeitos negativos sobre a planta, o solo e os animais. O uso continuado destes pesticidas leva ao aumento da resistência das pragas, ou até mesmo ao surgimento de outras. Neste contexto, há necessidade de serem criadas alternativas biológicas, que sejam menos prejudiciais (Gupta *et al*, 2011). Ao longo dos tempos, os óleos essenciais de origem vegetal têm despertado muito interesse, pelo seu potencial inseticida, fungicida e bactericida (Regnault-Roger, 1997; Isman *et al.*, 2000, Burt *et al*, 2004)

Existem plantas que são de uso tradicional em Agricultura Biológica como meio de proteção contra praga e doença, mas que não são indicadas no regulamento europeu relativo aos produtos fitossanitários autorizados, provavelmente por não serem considerados produtos fitofarmacêuticos e serem geralmente preparados na própria exploração agrícola.

Os biopesticidas, atualmente, têm grande importância e são alvo de pesquisas científicas, na busca de alternativas aos pesticidas de síntese. Estes podem ser agrupados em diferentes categorias consoante a sua origem, decocções, infusões, macerados, ou consoante a finalidade a que se destina, inseticida, nematodocida, fungicida, etc. (Garrido, 2005). Podem ser obtidos a partir de várias partes da planta, tais como, folhas, raízes, ramos ou tronco.

A maceração consiste em colocar a planta, cortada em pedaços mais pequenos, em água à temperatura ambiente, durante 24 horas. Após esse tempo, filtra-se e aplica-se sem diluir. Não se deve armazenar, pois poderia desencadear o processo de fermentação (Bertrand, 2008).

Ao contrário da maceração, a infusão é feita colocando água quente sobre a planta, também em pedaços mais pequenos. A infusão de plantas não deve ser armazenada, no máximo pode ser guardada durante alguns dias, no frigorífico (Bertrand, 2008).

As substâncias obtidas das plantas são uma mistura complexa de terpenóides, essencialmente monoterpenos e sesquiterpenos e de fenóis, óxidos, álcoois, cetonas, éteres, esterres e aldeídos que conferem o odor e o aroma que caracteriza a planta de onde são provenientes. A presença desses monoterpenos voláteis permite que as plantas se defendam de pragas, nomeadamente insetos herbívoros e fungos patogénicos (Langenheim, 1994 *in* Batish, 2008)

As plantas aromáticas e os seus óleos essenciais/derivados, têm sido utilizados desde a antiguidade, pelo seu aroma e cheiro, como condimento ou princípio ativo num medicamento,

como agente repelente ou protetor de produtos armazenados (Batish,2008). Os extratos de origem vegetal têm inúmeras vantagens, em relação os pesticidas sintéticos, no controlo de nemátodes e não só. São potencialmente menos tóxicos do que os compostos sintéticos, visto serem menos concentrados. São biodegradáveis e para além disso apresentam um amplo espetro e uma ação seletiva dentro de cada grupo de pragas, evitando por isso o desenvolvimento de resistências ao mesmo (Quarles,1992 *in* Coimbra,2006; Oka, 2000 *in* Marino, 2012)

Atualmente sabe-se que existem muitas plantas que possuem óleos essenciais e fitoquímicos com propriedades nematodocida (Chitwood, 2002). Como exemplo podem referir-se os óleos essenciais de *Carum carvi*, *Foeniculum vulgare*, *Mentha rotundifolia* e *Mentha spicata* (Oka, *et al*, 2000), três plantas da família *Lamiaceae* (*Ocimum basilicum*, *Ocimum. sanctum* e *Mentha piperatum*) e duas da família *Myrtaceae* (*Callistemon lanceolatus* e *Eugenia caryophyllata*) (Sangwan *et al.*,1990) possuem propriedades nematodocida. Algumas plantas do género *Eucalyptus* também já foram referenciadas pelo potencial nematodocida que apresentam (Pandey *et al.*, 2000, Salgado *et al.* 2003, Ibrahim *et al*, 2006 *in* Batish,2008). O estudo realizado por Kong *et al*, 2006, mostrou que *Artemisia absinthium*, *Artemisia. dracunculus*, *Cymbopogon citratus*, *Menthan pulegium*, *Myrtus communis*, *Origanum vulgare*, *Salvia officinalis* e *Thymus mastichina* também apresentam potencial nematodocida.

Chitwood (2002) referiu que a utilização de óleos essenciais, em vez de compostos purificados ou sintéticos, podem resultar e ter efeitos benéficos, para além de controlarem os nemátodes. A utilização de extratos de plantas poderá também trazer benefícios por poder existir sinergia entre vários compostos constituintes (Chitwood,2002). Um modo se procurar esses compostos nematodocida é fazer um rastreio em plantas onde estes compostos existam naturalmente, tais como, alcaloides, fenóis, sesquiterpenos, entre outros (Oka,2000).

Os óleos essenciais de plantas assim como os seus constituintes foram já referidos como possuindo atividade nematodocida em relação ao NMP (Park *et al.*, 2005;Kim *et al.*,2008). De facto, são vários os estudos que têm sido realizados na tentativa de encontrar uma alternativa aos pesticidas de síntese. Por exemplo, Choi *et al.* (2007) estudaram o efeito nematodocida de óleos essenciais de 29 plantas. Destas, apenas quatro mostraram eficácia de 100%, em relação ao nemátode. Contudo, os valores de LC₅₀ foram diferentes, para diferentes estádios do nemátode.

Neste estudo de Choi *et al.* (2007) é também feita referência a outras plantas cujos óleos essenciais apresentam atividade nematodocida, tais como: alcarávia (*Carum carvi*), funcho (*Foeniculum vulgare*), hortelã-branca (*Mentha rotundifolia*), hortelã-verde (*Mentha spicata*) (Oka *et al.*,2000), manjerição (*Ocimum basilicum*), tulase (*Ocimum sanctum*), hortelã-pimenta (*Mentha piperatum*), escova-de-garrafas (*Callistemon lanceolatus*), cravo-da-india (*Eugenia caryophyllata*) (Sangwan *et al.*,1990) alho (*Allium sativum*) e canela (*Cinnamomum zeylanicum*) (Park *et al.*,2005)

Num outro estudo, realizado por Kim e seus colaboradores (2008), investigou-se a atividade nematodocida de óleos essenciais comerciais de 28 plantas e alguns dos seus compostos em relação a *B. xylophilus*. Pelos resultados obtidos, apenas três dos óleos essenciais testados, o de *Coriandrum sativum*, *Liquidambar orientalis* e *Valeriana wallichii* mostraram um efeito notório sobre NMP, tendo estes três óleos sido testados a diferentes concentrações 1,0mg⁻¹, 0,8mg⁻¹ e 0,6mg⁻¹, tendo sido observada eficácia relevante.

Elbadri *et al.* (2008) avaliaram também, em laboratório, o potencial nematodocida de cinco óleos essenciais e de 15 extratos de plantas em relação ao NMP. Os resultados mostraram que os óleos essenciais de cravo-da-Índia (*Syzygium aromaticum*), mostarda (*Brassica integrefolia*), tomilho (*Thymus vulgaris*) e *Pelargonium inquinans* foram altamente eficientes no controlo do nemátode. Apenas um extrato, o de magnólia (*Magnolia officinalis*) mostrou resultados promissores.

Recentemente, um estudo evidenciou, pela primeira vez, o efeito nematodocida de figueira (*Ficus carica*) em relação ao NMP (Liu *et al.*,2011)

Estudos com plantas da flora portuguesa foram realizados por Barbosa *et al.* (2010,2011) nos quais se salienta o potencial nematodocida de carqueja (*Chamaespartium tridentatum*), oregão (*Origanum vulgare*), segurelha (*Satureja montana*), tomilho-de-creta (*Thymbra capitata*) e erva-úrsula (*Thymus caespititius*). Foi ainda estudado o potencial nematodocida de 16 espécies de eucalipto (*Eucalyptus* spp.), seis espécies de tomilho (*Thymus* spp.) e quatro espécies de menta (*Mentha* spp.) (Faria *et al.*, 2011). Nestes estudos foram realçados os potenciais dos óleos essenciais das referidas plantas.

Entre as várias plantas utilizadas no controlo de inimigos das plantas encontram-se a urtiga-maior (*Urtica dioica* L.) (Fig.8) e a urtiga-menor (*Urtica urens* L.) (Fig.9), da família *Urticacea*. De fato, a urtiga é tradicionalmente usada em agricultura biológica como meio de

proteção contra pargas e doenças, apesar de não ser indicada no regulamento europeu relativo aos produtos fitossanitários autorizados em agricultura biológica, provavelmente porque não são produtos fitofarmacêuticos e são preparados na própria exploração agrícola. Ambas as espécies de urtiga são utilizadas no controlo de piolho e ácaros na forma de chorume em fermentação e maceração, respetivamente (Ferreira *et al.*, 2012b)

Em termos culturais, as urtigas preferem solos molhados e ricos em nutrientes, crescem em mancha nos terrenos. Em relação ao ciclo vegetativo, a urtiga-maior é perene enquanto a urtiga-menor é anual. Ambas são plantas com folhas serrilhadas e com uma forma muito semelhante a um coração. As duas têm as folhas e caule cobertos com pêlos urticantes, sendo os da urtiga-menor mais suaves e menos agressivos do que os da urtiga-maior. A cor das folhas de ambas as urtigas é verde, sendo que, da urtiga-maior é um verde mais escuro (Alternative Medicine Review, 2007; Bertrand *et al.*, 2008).



Figura 8- Urtiga maior (*Urtica dioica* L.)



Figura 9- Urtiga menor (*Urtica urens* L.)

Em termos de constituintes, as urtigas são ricas em ácido fórmico, histamina, acetolina, ácido acético, ácido butírico, leucotrienos, 5-hidroxitriptamina entre outras substâncias irritantes à pele. Uma picada de urtiga pode levar ao desenvolvimento de uma ligeira comichão e/ou dormência, que pode durar uns minutos ou mesmo dias (Alternative Medicine Review, 2007). No entanto, os extratos de urtiga não causam estas reações, pois os pêlos urticantes são destruídos aquando da sua preparação (Alternative Medicine Review, 2007).

As urtigas foram usadas durante séculos para uma infinidade de propósitos e continuam a ser colhidas para diversos fins, tais como alimentação, medicina, têxteis, cosméticos e agricultura (Alternative Medicine Review, 2007)

Os constituintes hidrófilos da urtiga, nomeadamente as lecitinas e polissacarídeos, parecem ser importantes na medicina humana, e os constituintes hidrofóbicos não são totalmente descartados. (Alternative Medicine Review, 2007)

A urtiga, para a Agricultura Biológica é vista como uma planta com imensas propriedades benéficas em termos de proteção vegetal. A urtiga-menor é essencialmente usada em medicina humana, enquanto a urtiga-maior é mais usada na agricultura, pois fortifica e estimula a flora microbiana do solo e melhora a função clorofílica das plantas. Os trabalhos de Rolf Peterson (Lünd, Suécia, 1981) têm demonstrado os efeitos fungicidas e inseticidas do extrato de urtiga-maior. (Bertrand, 2008). Segundo Vicente Gerbe (2009) o chorume de urtiga tem uma ação preventiva contra insetos, sobretudo pulgões. Tem também uma ação estimulante e fertilizante para o solo.

Segundo Bertrand (2008) os extratos fermentados são os que merecem um lugar de honra, pois são os que têm mais interesse em termos de preparados à base de plantas. Muitos ensaios já foram feitos por especialistas nestes últimos anos, tendo sido obtidos resultados muito interessantes em termos de proteção vegetal.

Os extratos de origem vegetal têm inúmeras vantagens, em relação aos pesticidas sintéticos, no controlo de nemátodes e não só. São potencialmente menos tóxicos do que os compostos sintéticos, visto serem menos concentrados. São biodegradáveis e para além disso apresentam um amplo espectro e uma ação seletiva dentro de cada grupo de inimigos das plantas, evitando, por isso o desenvolvimento de resistências ao mesmo (Quarles, 1992 *in* Coimbra, 2006; Oka, 2000 *in* Marino, 2012).

Apesar de ser a urtiga-menor a mais usada em medicina, a urtiga-maior também tem sido alvo de vários estudos nesse campo. A urtiga maior tem sido utilizada no tratamento de doenças e disfunções, tais como reumatismo, eczema e anemia (Chrubasik *et al*,1997; Bone *et al*, 2000 in Penelli,2008).

Na indústria têxtil a urtiga-maior é utilizada para a produção de pigmentos e corante verde e as fibras são utilizadas para fazer cordas e papel (Herbalistes sans Frontières, 2013).

4. METODOLOGIAS

4.1. Obtenção, manutenção e propagação da cultura de *Botrytis cinerea* e de *Bursaphelenchus xylophilus*

As culturas iniciais do fungo *Botrytis cinerea* e do NMP, *Bursaphelenchus xylophilus* utilizadas neste trabalho utilizado para fazer as repicagens nas várias placas de Petri, foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Nematologia do Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra. Posteriormente, estas culturas foram mantidas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, utilizando a metodologia que a seguir se descreve. O meio de cultura para o crescimento do fungo foi preparado com auxílio de uma placa de aquecimento com agitação. Para a preparação de 1 L de meio de cultura para crescimento do fungo, utilizou-se um frasco de Erlenmeyer de 2 L, onde se colocaram 100 mL de água destilada, e posteriormente, adicionaram-se 30 g de extrato de malte, 15,7 g de ágar granulado e 100mL de glicerol. Perfez-se depois o volume de 1L com água destilada. O balão de Erlenmeyer com meio de cultura foi esterilizado numa autoclave, durante 20 minutos a 120°C. Seguidamente, deixou-se arrefecer o meio até cerca de 50°C, tendo sido depois adicionado 1 mL de uma solução de ampicilina (100 mg de ampicilina em 1 mL de água destilada), esterilizada por filtração através de malha 0,2 µm. O meio de cultura foi distribuído por caixas de Petri de plástico, de 9 cm de diâmetro, estéreis até cerca de metade da sua altura. Após o meio ter solidificado, as caixas de Petri foram invertidas e guardadas num frigorífico, a 4°C, até à sua utilização.

Na câmara de fluxo laminar horizontal, foi feita a inoculação de algumas caixas de Petri, retirando um pequeno pedaços do meio colonizado pelo fungo da caixa de Petri com a cultura “reserva” inicial, para caixas com novo meio de cultura. As caixas foram seladas com Parafilm M® e conservadas à temperatura ambiente. Para estas caixas de Petri, após o desenvolvimento do fungo até cerca de ¾ da caixa e com o auxílio de um bisturi, transferiu-se um pedaço de meio de cultura contendo NMP, da caixa de Petri com a cultura reserva de NMP. As caixas, após terem sido novamente seladas com Parafilm M®, foram colocadas dentro de um saco de plástico, que após ter sido devidamente fechado, foi colocado dentro de uma caixa de plástico e mantidas à temperatura ambiente. Quando se verificou que os nemátodes tinham consumido quase todo o fungo disponível (após 30 dias), os nemátodes moveram-se para a tampa da caixa de Petri, de onde foram então recolhidos, com o auxílio de

um esguicho de água destilada, para um copo de vidro (Fig.10a), tendo a suspensão de NMP sido distribuída por caixas de Petri de vidro de 3cm de diâmetro (Fig.10b) e de seguida foram utilizados nas experiências.

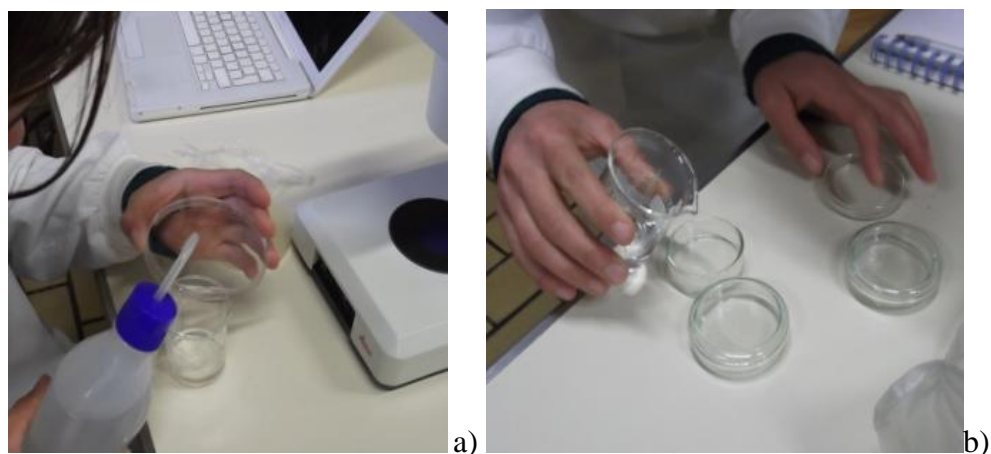


Figura 10- a) Recolha de NMP do meio de cultura para um copo de vidro; b) Distribuição da suspensão de NMP para caixas de Petri de vidro

4.2. Preparação dos extratos de urtiga-maior e de urtiga-menor

De urtiga-maior foram preparados dois tipos de extrato, um designado fresco armazenado (ARM.) e outro de extrato fresco. As plantas utilizada na preparação do primeiro extrato foram colhidas nos canteiros do Jardim de Plantas Aromáticas da Escola Superior Agrária de Coimbra, localizado junto à canforeira, enquanto que, para o segundo extrato foram colhidas na vala de água, junto ao Caldeirão, na Escola Superior Agrária de Coimbra.

Da urtiga-menor foi apenas preparado um tipo de extrato, o fresco, tendo sido colhidas plantas num campo da Quinta do Caneiro, freguesia de Mucelão, S.Martinho da Cortiça, Arganil.

As plantas foram recolhidas em locais diferentes de modo a que apresentassem o mesmo estado fenológico. Esta necessidade surgiu porque as experiências foram realizadas em épocas diferentes do ano, por não ter sido possível realizar todas as experiências em simultâneo, uma vez que a Aluna, por ter estatuto de Trabalhador Estudante, teve o tempo dispensado ao trabalho aqui apresentado fortemente condicionado.

Para a preparação dos extratos de urtiga-maior foi preparado adaptou-se a metodologia descrita por Ferris e Zheng, (1999). Tanto os extratos armazenados como os frescos foram preparados através de maceração (M) (Figs.11 A, B) e de infusão (I) (Figs.12 A, B) com duas concentrações, 1:5 e 1:10.

Inicialmente as folhas de urtiga foram escolhidas, rejeitando as que apresentavam qualquer tipo de sintoma ou estrago. Foram devidamente lavadas com água da torneira, secas com papel absorvente e depois pesadas. As duas concentrações de maceração, foram preparadas utilizando-se dois almofarizes de porcelana, previamente identificados. Em cada um, colocaram-se 10 g de urtiga, foram adicionados 100 e no outro 50 mL de água destilada, à temperatura ambiente, para preparar a concentração de 1:10 e 1:5, respetivamente. Após maceração, os almofarizes foram tapados com papel de alumínio.

Também foram preparadas duas concentrações de infusão, tendo-se utilizado dois copos de vidro de 100 mL, devidamente identificados e envolvidos com papel de alumínio, de modo a proteger da luz exterior. Em cada um dos copos foram colocados 10 g de urtiga. Posteriormente, adicionaram-se 100 e 50 mL de água destilada a 95°C, para preparar as concentrações de 1:10 e 1:5, respetivamente.

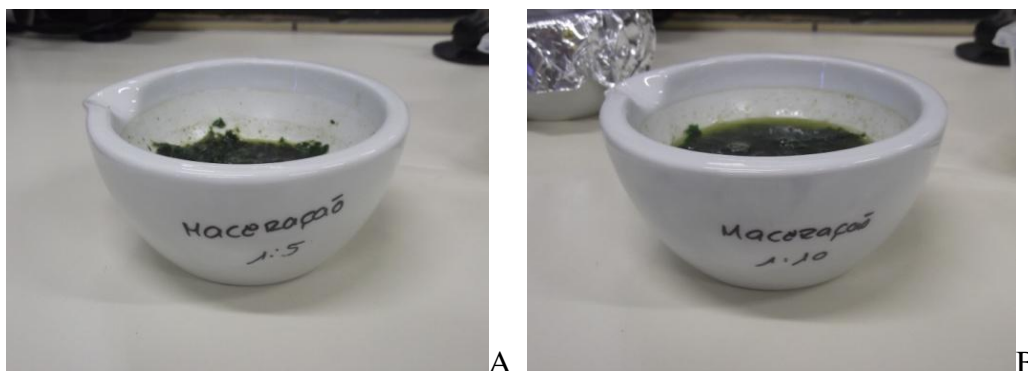


Figura 11- A- Maceração 1:5; B- Maceração 1:10

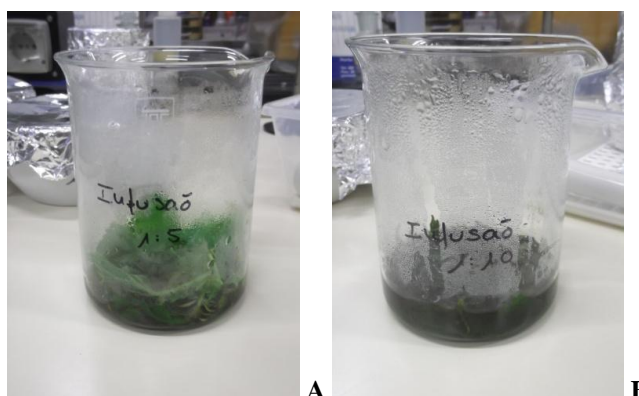


Figura 12-A- Infusão 1:5; B- Infusão 1:10

Após 24 horas, os extratos preparados através de maceração e de infusão foram centrifugados numa centrifugadora ROTANTA 460 R- Hettich Zentrifugen (Fig.13) e filtrados com uma bomba de vácuo com filtro Sartorius (Fig.14). Estes extratos foram colocados dentro de frascos de vidros SCHOTT (Fig.15), devidamente envolvidos em papel de alumínio e identificados. Os extratos foram armazenados durante 4 meses no frigorífico e posteriormente testados.

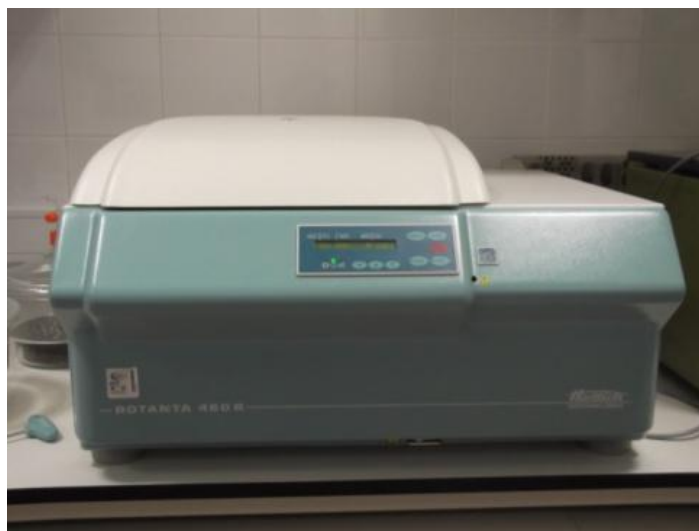


Figura 13-Centrífuga ROTANTA 460 R- Hettich Zentrifugen



Figura 14-Sistema de filtração com filtro Sartorius



Figura 15- Frascos de vidro SCHOTT, envolvidos em papel de alumínio e identificados

Os extratos frescos de urtiga-maior e de urtiga-menor foram preparados, seguindo a metodologia descrita anteriormente, tendo portanto as mesmas concentrações que os extratos frescos armazenados (1:5 e 1:10). Estes extratos frescos foram usados logo depois de serem centrifugados e filtrados.

4.3. Efeito dos extratos sobre o Nemátode-da-Madeira-do-Pinheiro

Inicialmente, preparou-se o material necessário para a realização das experiências. Foram previamente desinfetadas com álcool etílico a 96%, caixas de Petri de 9 cm de diâmetro. Após evaporação do álcool, em cada caixa de Petri, foi colocada uma lâmina de vidro escavada, também desinfetada com álcool. Foram também desinfetados os blocos de vidro escavados e devidamente organizados e identificados dentro de uma caixa de plástico (Fig.16A).

Para cada uma das lâminas, com o auxílio de uma pestana colocada na extremidade de uma vareta de vidro e de uma lupa, foram transferidos 20 nemátodes. Posteriormente, os nemátodes de cada uma das lâminas foram transferidos para os blocos escavados contendo 1 mL de extrato de urtiga (M1:5, M1:10, I1:5 e I1:10). Para cada tratamento foram feitas 5 repetições, sendo a testemunha água destilada esterilizada. Os ensaios decorreram no escuro, numa câmara húmida e à temperatura ambiente (Fig. 16B). Estas condições pretendiam simular o ambiente dentro da árvore.

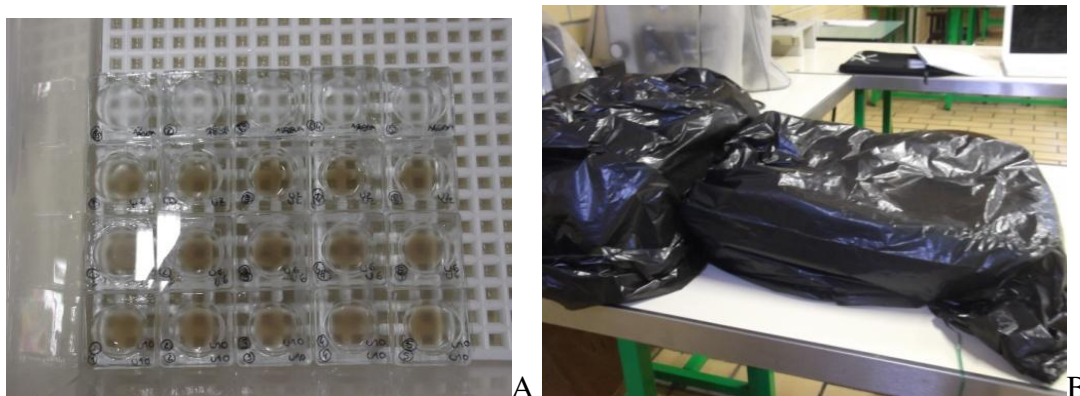


Figura 16- A-Blocos de vidro escavados devidamente organizados dentro da caixa; b) Caixas no escuro.

Para cada um dos extratos testados, extrato fresco de urtiga-maior armazenado, extrato fresco de urtiga-maior e extrato fresco de urtiga-menor, o procedimento foi semelhante.

As observações foram realizadas às 12 e às 24 horas, e depois todas as 24 horas, até 168 horas após o início das experiências, com o auxílio de uma lupa. Foram contabilizados os nemátodes imóveis, isto é, que não apresentam mobilidade aquando da observação mas que, após tocados com uma pestana recuperavam a mobilidade, assim como os nemátodes mortos, ou seja, os que quando tocados com a pestana não apresentavam mobilidade e depois de colocados em água destilada, durante meia hora, e novamente tocados com a pestana continuavam sem mobilidade.

Os valores de mobilidade e mortalidade foram corrigidos em relação ao controlo de acordo com a fórmula de Abbott (1925):

$$\text{Mortalidade cumulativa corrigida (\%)} = \frac{M_E - M_T}{100 - M_T} \times 100$$

onde M_E representa a mortalidade observada nos diferentes tratamentos e M_T representa a mortalidade observada nos controlos com água destilada.

Posteriormente, para cada tempo de observação foi calculada a média e o respetivo desvio padrão e realizada uma análise de variância uni-fatorial (one-way ANOVA) utilizando o programa GraphPad Prism5. Quando se verificaram diferenças estatisticamente significativas foi realizado o teste de Tukey, para se verificar entre que modalidades existiam essas diferenças. Os testes foram realizados para um nível de significância de $p=0,05$ (Zar, 1996).

5. RESULTADOS

5.1. Efeito dos extratos de urtiga na mobilidade do nemátode-da-madeira-do-pinheiro, *Bursaphelenchus xylophilus*

O primeiro resultado que pode ser retirado desta experiência é a diferença entre os extratos frescos armazenados (Fig.17) e os extratos frescos (Fig.18 e Fig.19). Os extratos que foram armazenados são mais claros e o precipitado que se forma é menos denso, ao contrário dos extratos frescos que são mais escuros e formam precipitados mais densos com o passar do tempo de observações

Dos extratos frescos testados, o de urtiga-maior (Fig.18) tem uma cor visivelmente mais escura e forma um precipitado mais denso que o de urtiga-menor (Fig.19).

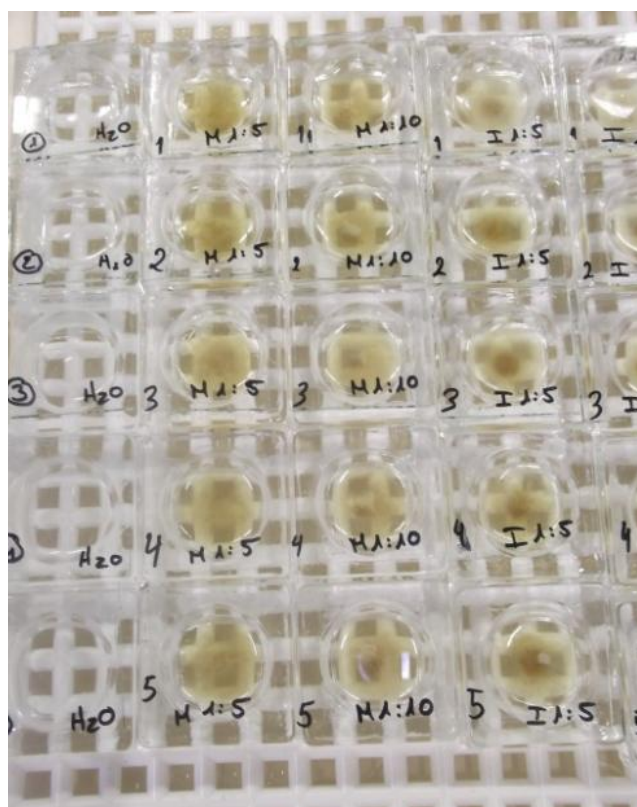


Figura 17- Blocos de vidro escavados com extrato fresco de urtiga-maior armazenado.

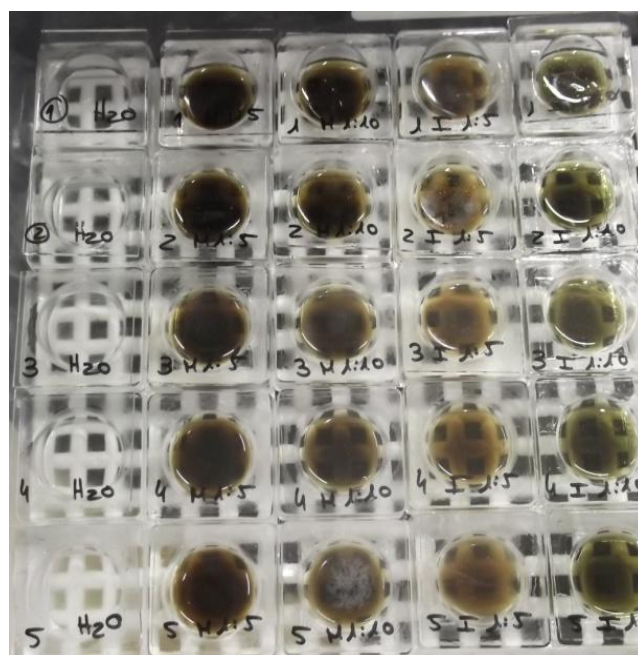


Figura 18- Blocos de vidro escavados com extrato fresco de urtiga-maior

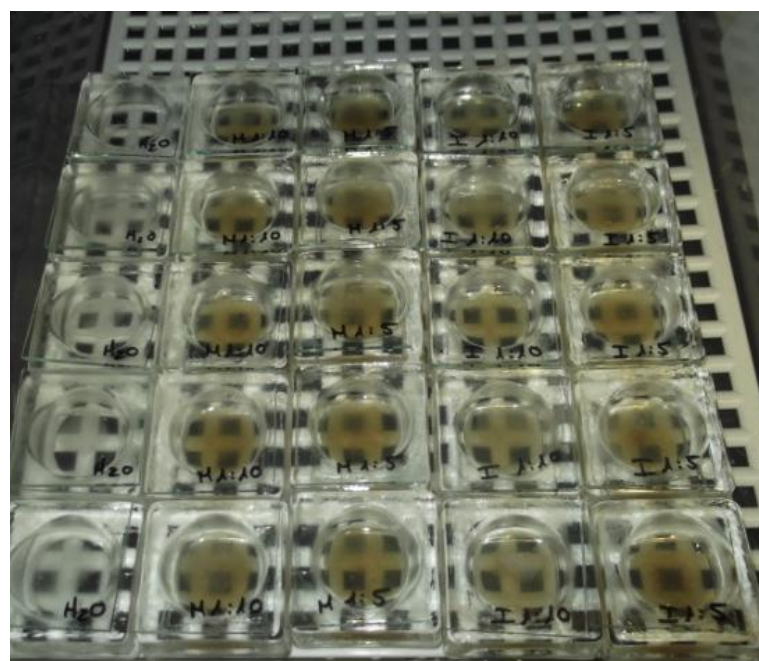


Figura 19-- Blocos de vidro escavados com extrato fresco de urtiga-menor

Os resultados obtidos para o efeito dos extrato de urtiga na mobilidade de *Bursaphelenchus xylophilus* encontram-se na Tabela 1 e nas Figuras 20 e 21.

Nas experiências, no tratamento-testemunha de água destilada, não foi observada imobilidade nem mortalidade, assim sendo, não se justificou fazer correções das percentagens de mobilidade nem de mortalidade cumulativa relativamente às testemunhas.

Tabela 1- Efeito dos extratos na mobilidade de *Bursaphelenchus xylophilus*.

Extratos	Tempo de exposição (horas)					
	12	24	48	72	96	168
	nº de nemátodes imóveis					
1	0,0± 0,00 a	0,0± 0,00 a	0,0± 0,00 a	0,0± 0,00 a	0,0± 0,00 a	0,0± 0,00 a
2	7,8± 4,58 b	1,4± 1,14 ab	0,0± 0,00 a	1,0± 0,71 a	9,2± 2,77 b	13,6± 2,07 b
3	0,0± 0,00 a	2,0± 1,58 b	12,4± 2,61 b	10,6± 2,97 b	2,6± 1,95 c	16,6± 1,95 c
4	2,0± 2,83 a	4,8± 2,86 c	4,0± 1,41 c	4,0± 0,71 c	4,4± 1,52 c	17,8± 0,84 d
5	1,0± 1,73 a	4,2± 2,39 c	8,0± 2,65 d	8,2± 3,63 d	7,8± 3,11 b	15,8± 1,48 a
6	20,0± 0,00 c	20,0± 0,00 d	4,4± 1,14 b	11,4± 1,34 b	12,8± 2,77 b	11,0± 1,00 b
7	17,2± 2,17 c	19,6± 0,89 d	13,4± 2,41 c	11,4± 2,41 b	11,0± 1,00 c	10,4± 2,07 b
8	2,6± 1,67 a	20,0± 0,00 d	20,0± 0,00 d	20,0± 0,00 de	20,0± 0,00 d	19,2± 0,84 c
9	1,6± 1,14 a	4,8± 1,79 c	20,0± 0,00 d	18,4± 1,14 d	17,8± 1,30 e	18,2± 0,84 c
10	20,0± 0,00 b	20,0± 0,00 b	20,0± 0,00 b	20,0± 0,00 b	6,0± 1,58 b	12,2± 1,48 b
11	20,0± 0,00 b	20,0± 0,00 b	20,0± 0,00 b	20,0± 0,00 b	18,4± 0,89 c	20,0± 0,00 c
12	20,0± 0,00 b	20,0± 0,00 b	20,0± 0,00 b	20,0± 0,00 b	18,8± 1,64 c	18,8± 1,30 d
13	20,0± 0,00 b	20,0± 0,00 b	20,0± 0,00 b	20,0± 0,00 b	20,0± 0,00 d	19,2± 1,10 cd

extratos: 1- água; 2- Extrato fresco de urtiga-maior ARM. (M1:5); 3- Extrato fresco de urtiga-maior ARM. (M1:10); 4- Extrato fresco de urtiga-maior ARM (I 1:5); 5- Extrato fresco de urtiga-maior ARM (I1:10); 6- Extrato fresco de urtiga-maior (M1:5); 7- Extrato fresco de urtiga-maior (M1:10); 8- Extrato fresco de urtiga-maior (I1:5); 9- Extrato fresco de urtiga-maior (I1:10); 10- Extrato fresco de urtiga-menor (M1:5); 11- Extrato fresco de urtiga-menor (M1:10); 12- Extrato fresco de urtiga-menor (I1:5); 13- Extrato fresco de urtiga-menor (I1:10)

Para todas as horas de observação, números seguidos da mesma letra não são estatisticamente diferentes ($p > 0,05$), de acordo com o teste de Tukey. Os resultados são média ± desvio-padrão de cinco repetições e corresponde ao número de nemátodes imóveis.

Em termos de mortalidade, esta foi observada no extrato fresco de urtiga-maior ARM., em M1:10 e I 1:10, 0,5% e 0,3% respetivamente, e manteve-se igual em todos os tempos de observação. O mesmo aconteceu no extrato fresco de urtiga-maior, em M1:5 e M1:10, com 1% e 0,5%, respetivamente (Anexo II)

Em termos de mobilidade, relativamente aos extratos frescos de urtiga-maior ARM., para M1:5, I1:5 e I1:10, foi registada desde o primeiro tempo de observação, 12h, 39%, 10% e 5% de imobilidade, respetivamente, e os restantes nemátodes encontravam-se ativos. Para o extrato fresco de urtiga-maior foi observada 100% de imobilidade para M1:5, 86% para

M1:10, 13% para I1:5 e 8% para I1:10. No que diz respeito ao extrato de urtiga-menor, no primeiro tempo de observação, foi registada 100% de imobilidade para as macerações e infusões.

Às 24h, para o extrato fresco de urtiga-maior ARM., foram de 7%, 10%, 24% e 21%, para M1:5, M1:10, I1:5 e I1:10, respetivamente, havendo por isso descida no número de nemátodes imóveis para M1:5 e subida em M1:10, I1:5 e I1:10. Para o extrato fresco de urtiga-maior, o número observado de nemátodes imóveis para M1:5 manteve-se igual, ou seja 100%, nos restantes, M1:10, I1:5 e I1:10 houve subida no número de nemátodes imóveis, 98%, 100% e 24%, respetivamente. Para o extrato de urtiga-menor o número de nemátodes imóveis manteve-se inalterado, ou seja, 100%.

Na observação feita às 48 h, foram registados valores de mobilidade um pouco diferentes aos anteriormente registados. No extrato fresco de urtiga-maior ARM., para M1:10 e I1:10 os valores subiram, 62% e 40% respetivamente, em M1:5 e I1:5 os valores não tiveram alterações significativas. No extrato fresco de urtiga-maior, em M1:5 e I1:10, os valores de mobilidade observados sofreram uma alteração significativa, comparando com os anteriormente observados, 22% e 100%, respetivamente. Para M1:10 e I1:5, os valores foram muito semelhantes aos da observação anterior. No extrato de urtiga-menor, os valores mantiveram-se iguais aos anteriores, ou seja, 100% de imobilidade.

De modo geral o valor de mobilidade dos nemátodes foi variando ao longo do tempo de observações para todos os extratos. Às 168h, o número de nemátodes imóveis, para o extrato fresco de urtiga-maior ARM. foi muito semelhante para a maceração e para a infusão, 68% e 83%, para M1:5 e M1:10 respetivamente, e 89% e 79% para I1:15 e I1:10. No extrato fresco de urtiga-maior, os valores para a maceração e infusão também foram muito semelhantes, 55% e 52% em M1:5 e M1:10 respetivamente, e 96% e 91% em I1:5 e I1:10. No extrato de urtiga-menor, os valores de imobilidade foram 61% para M1:5, 100% para M1:10, 94% para I1:5 e 96% para I1:10.

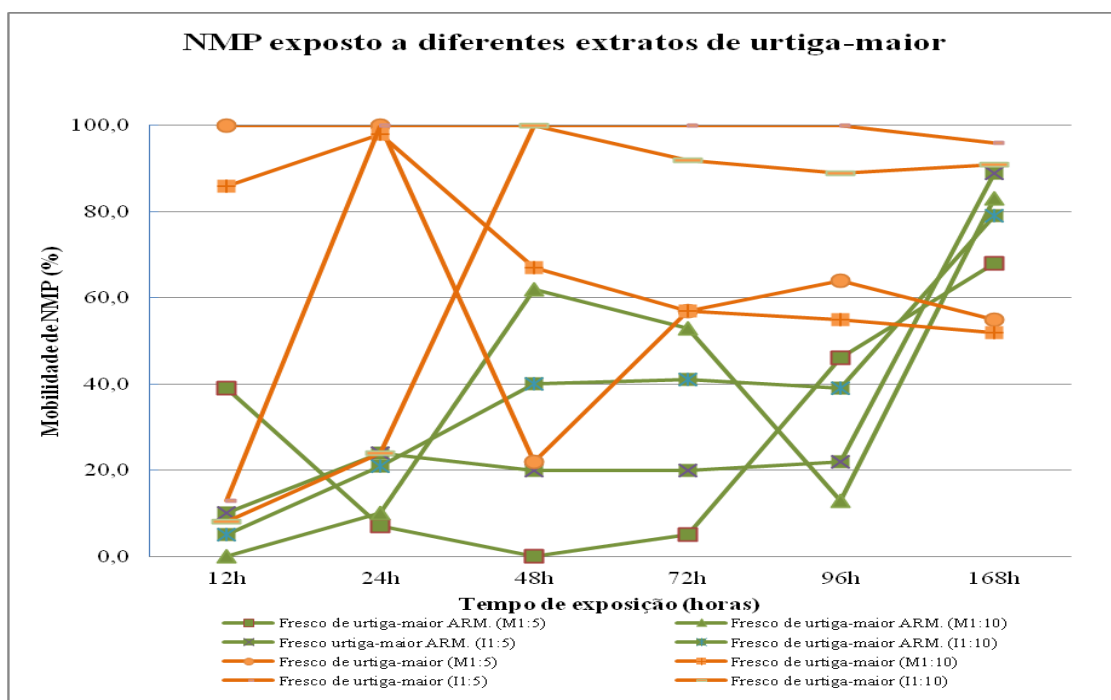


Figura 20- Percentagem de mobilidade de NMP expostos a diferentes extratos de urtiga-maior

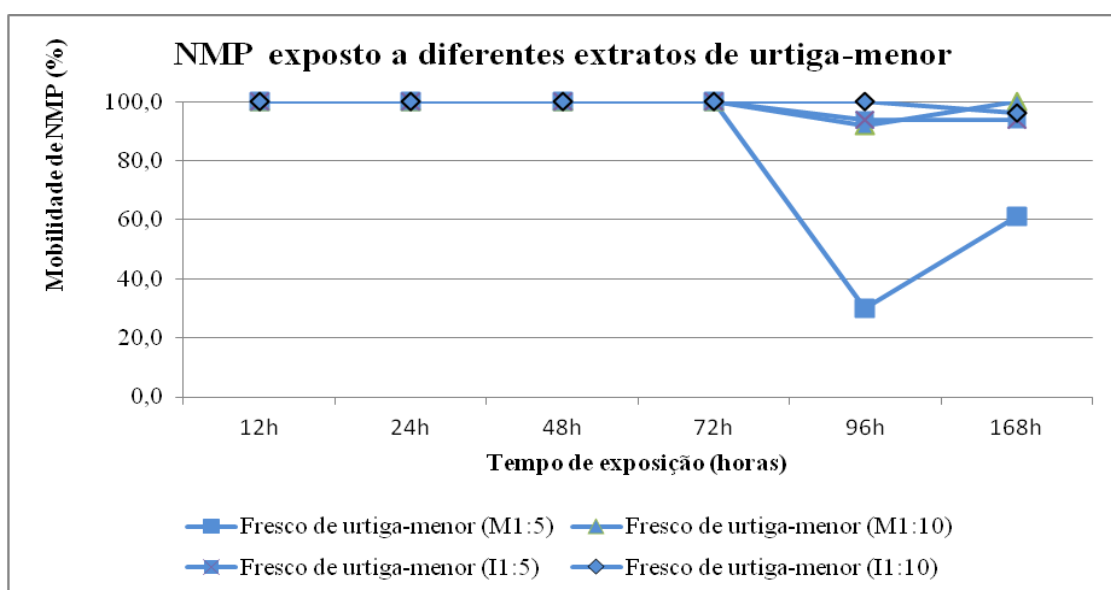


Figura 21- Percentagem de mobilidade de NMP expostos a diferentes extratos de urtiga-menor

6. DISCUSSÃO

Os nemátodes fitoparasitas são considerados, entre os inimigos das culturas, os que mais prejuízos causam nas culturas e de mais difícil controlo (Bird *et al.*, 2009 *in* Andrés, 2012). Entre eles, o NMP é um problema de importância indiscutível, para a floresta portuguesa e que brevemente se tornará um problema europeu, se estratégias de controlo eficazes não forem encontradas. De fato, com base na dispersão atual da doença da murchidão do pinheiro, as medidas que têm vindo a ser implementadas não têm conseguido impedir a disseminação desta doença.

A agricultura biológica tem-se desenvolvido essencialmente devido a várias preocupações entre as quais ambientais, com a perda de espécies e habitats selvagens, poluição de origem agrícola, assim como com os resíduos de pesticidas e outros produtos tóxicos nos alimentos e do seu impacto ambiental (Ferreira, 2012a). Neste trabalho procurou-se estudar o efeito da urtiga, já amplamente utilizada em agricultura biológica, devido ao seu potencial biocida entre outros efeitos benéficos. De facto, a urtiga apresenta uma composição rica em elementos orgânicos e minerais que fortalecem as plantas e estimula a flora microbiana do solo, podendo também possuir propriedades fungicidas, quando o extrato é preparado com infusão, e inseticida, quando se trata de extrato fermentado (Bertrand *et al.*, 2008; AGROBIO, 2011)

No entanto, atualmente não existem estudos que comprovem que as urtigas tenham ação nematodocida.

Os resultados obtidos neste trabalho são indicativos do potencial efeito nematostático das duas espécies de urtiga sobre o NMP. O extrato de urtiga-menor teve um efeito mais rápido e duradouro do que o de urtiga-maior, tanto com maceração como com infusão. O presente estudo vem evidenciar que os extratos de urtiga poderão vir a contribuir para um controlo biológico do NMP. Comparando a análise química da urtiga-maior (*Urtica dioica*) realizada por Ilies (2012) com a análise química das plantas que se comprovou terem potencial nematodocida no estudo feito por Barbosa (2010), existem compostos químicos iguais, como por exemplo o benzaldeído, α -pineno, cânfora, carvacrol, entre outros compostos, que mostraram ter potencial nematodocida contra o NMP, o que pode justificar o elevado número de nemátode imóveis nos vários extratos de urtiga testados.

Um estudo de Broekaert (1989) revelou que as raízes da urtiga contêm lecitina. Esta proteína apresenta especificidade para a ligação à quitina que reverte o corpo de algumas pragas das culturas. A sua atividade antifúngica e antiviral pode ser utilizada para o controlo de pragas e doenças das culturas (Lam *et al.*, 2010; Broekaert *et al.*, 1989). Noutro estudo *in vitro* realizados por Gaofu e colaboradores (2007) verificou-se o potencial nematodocida de lecitinas de algumas plantas em relação ao NMP. Embora estas proteínas inibam a atividade de muitos insetos, o seu potencial ainda não tinha sido relatado em relação ao NMP. No entanto, será também importante realizar mais testes que comprovem estes resultados, para além de que, será também importante saber em que local estas proteínas atuam no corpo do nemátode. O autor refere que, se estas proteínas são realmente tóxicas para o NMP, os seus genes podem vir a ser a base de mais estudos para a engenharia genética.

Assim, justifica-se um estudo mais aprofundado destas plantas, nomeadamente estudar o efeito das plantas através da utilização de outros protocolos da preparação de extratos, por exemplo a descrita por Ferreira (2012b). O chorume de plantas fermentado é preparado da seguinte forma: após a colheita das plantas, estas são colocadas num saco permeável e imersas com o auxílio de um peso, num recipiente com água, mexendo-se uma vez por dia. Este chorume está pronto a ser usado passados 3 a 4 dias, devendo ser diluído 50 vezes antes da sua aplicação. Na maceração utiliza-se a planta toda, exceto a raiz. Mergulha-se a planta fresca em água, durante 12 horas, na proporção de 1 Kg de planta para 10L de água, ou seca, na proporção de 200g para 10 L de água.

Em termos da metodologia utilizada nos ensaios *in vitro*, em comparação com a utilizada por Kim *et al.*, (2008) ou Barbosa *et al.* (2010) por exemplo, esta permite saber com o maior rigor o número de nemátodes imóveis e mortos em cada um dos blocos escavados, o que não se verifica quando se utiliza uma suspensão com um número estimado de nemátodes.

As diferenças de cor entre os extratos frescos e frescos armazenados, os frescos mais escuros que os frescos armazenados, revelam que durante o tempo em que o extrato está armazenado há destruição de alguns constituintes da urtiga, assim como dos pigmentos de coloração. As diferenças de coloração entre extratos feitos através de maceração e infusão, levam a crer que, ao macerarmos as urtigas há a destruição das células vegetais, levando uma maior libertação dos seus constituintes para o exterior. Foi também nos extratos obtidos por maceração, que se verificou haver maior quantidade de precipitado, pois, em contacto com o ar, os compostos existentes no meio, oxidam muito mais rapidamente que os dos extratos

feitos por infusão (comunicação oral, Filipe Melo). A coloração de extratos frescos, dos dois tipos de urtiga também revelou que é a urtiga-maior que apresenta uma coloração mais escura, o que vem justificar a escolha de Patrizia Penelli (2008) no seu estudo, onde extraiu e analisou folhas, caules e fibras de urtiga-maior.

Muitas plantas têm sido alvo de investigação científica, na procura de pesticidas mais seguros para o ambiente (biocidas). Os óleos essenciais das várias plantas estudadas poderão ser apontados como potenciais alternativas de proteção de plantas, quer devido às suas próprias características, quer servindo como compostos modelo para o desenvolvimento de químicos de síntese com atividade potenciada (Chitwood, 2002; Park *et al.*, 2005).

Apesar dos resultados obtidos nos vários estudos já realizados com plantas, onde foi comprovada a eficácia dos mesmos como nematodocida, estes foram feitos *in vitro*, o que pode não garantir que no meio ambiente estes resultados também sejam obtidos. Assim sendo, há necessidade de serem realizados mais estudos, tendo em atenção a sua ação no sistema da planta no meio ambiente.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo permitiu concluir que o extrato fresco de urtiga tem maior efeito nematostático comparando com os extratos fermentados de urtiga. Neste caso, foi o extrato de urtiga-menor que teve um resultado mais rápido e duradouro sobre os nemátodes, imobilizando-os mais rapidamente e durante mais tempo, o que pode trazer algumas vantagens no seu controlo, nomeadamente na aplicação de outra substância, que por um lado os elimine, mas que demore algum tempo a atuar.

A utilização do extrato de urtiga veio abrir mais uma porta na luta contra o NMP, mas que requer ainda mais estudos, de modo a clarificar qual a substância que realmente imobiliza os nemátodes. Sendo os extratos frescos os que apresentam resultados mais promissores, é necessário que estes sejam aplicados rapidamente, pois precipitam à temperatura ambiente.

Para além das muitas propriedades benéficas para a agricultura que a urtiga tem, este trabalho vem mostrar mais uma propriedade, o efeito nematostático sobre o nemátode-da-madeira-do-pinheiro.

Bibliografia

- > Abbott W.S. (1925) A method of computing the effectiveness of an insecticide, *Journal of Economic Entomology*, 18: 265-266.
- > Abelleira A., Picoaga A., Mansilla L.P., Aguin O. (2011) Detection of *Bursaphelenchus xylophilus*, causal agent of pine wilt disease on *Pinus pinaster* in Northwestern Spain. *Plant Disease*, 95 (6), 776.
- > Abrantes I. (2009). O que é o nematode? Instituto do mar- Centro do mar e ambiente/Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra. Seminário ESAC Coimbra e CFPIIMM Lordelo. [em linha, consultado em 18 de Agosto de 2011] Disponível em http://www.esac.pt/cernas/nematode_apresentação/Isabel%20Abrantes_O_que_o_nematode.pdf
- > Agrios G.N. (2005) *Plant Pathology*. Elsevier, United States of America, p.870
- > AgroBio-URTIGA. Oquintalbio (21 de abril de 2011) [em linha, consultado a 15 de maio de 2013] Disponível em: <http://oquintalbio.blogspot.pt/2011/04/urtiga.html>
- > Andrés M.F., González-Coloma A., Sanz J., Burillo J., Sainz P. (2012) Nematocidal activity of essential oils: a review. *Phytochemical Review*, DOI 10.1007/s11101-012-9263-3
- > ANÓN.1 (sd). Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas.
- > ANÓN.2 (sd). Chemicals *in* OILS AND PLANTS. [em linha, consultado a 19 de Julho de 2012]. Disponível em: <http://www.oilsandplants.com/eucalyptol.htm>
- > ANÓN.3 (sd). Eucalyptus oil. [em linha, consultado a 19 de Julho de 2012] Disponível em <http://en.wikipedia.org/wiki/Eucalyptusoil>
- > ANÓN.4 (sd), Direcção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural. [em linha, consultado a 2 de Agosto de 2012] Disponível em <http://www.dgadr.pt/fitofarmaceuticos/lista/Introdlista/insecacarlista.htm>
- > ANÓN.5 (sd). Wikipédia, a enciclopédia livre. [em linha, consultado a 6 de Agosto de 2012] Disponível em <http://pt.wikipedia.org/wiki/Alho>
- > ANÓN.6 (sd) Óleos essenciais .org. [em linha, consultado a 8 de setembro de 2012]. Disponível em: <http://oleosessenciais.org/cinamaldeido-ou-aldeido-cinamico/>

- > ANÓN.7 (sd), Ficha Técnica-Nemátode da Madeira do Pinheiro. [em linha, consultado 18 de agosto de 2011] Disponível em <http://www.forestis.pt/pagina,115,115.aspx>
- > Arnason J.T., Philogène B.J.R., Morand P., Imire K., Iyengar S., Duval F, Soucy-Breau C., Scaiano J.C., Werstiuk N. H., Hasspieler B., Downe A.E.R. (1989) Naturally occurring and synthetic thiophenes as photoactivated insecticides. *In* Insecticides of Plant Origin (J.T. Arnason, B.J.R. Philogène and P. Morand eds.) ACS Symposium Series 387, American Chemical Society, Washington, DC, pp. 164-172
- > Badgley C., Moghtader J., Quintero E., Zakem E., Chappell M.J., Avilés- Vázquez K., Samulon A., Perfecto I. (2007) Organic agriculture and the global food supply. *Renewable Agriculture and Food Systems*. Cambridge University Press, 22:86-108
- > Barbosa P., Lima A.S., Dias L.S., Tinoco, M.T., Barroso J.G., Pedro L.G. (2010). Nematicidal activity essential oils volatiles derived from portuguese aromatic flora against pine wood nematode. *Journal of Nematology* 42(1):8-16. (*Bursaphelenchus xylophilus*). [em linha, consultado a 25 de Agosto de 2011]. Disponível em, <http://www.mendeley.com/research/nematicidal-activity-essencial-oils-volatiles-derived-portuguese-aromatic-flora-against-pinewood-nematode-bursaphelenchus-xylophilus/>
- > Batish D.R., Singh H. P., Kohli R. K., Kaur S. (2008). Eucalyptus essencial oil as a natural pesticide. *Forest Ecology and Management* 256 (2008) 2166-2174. [em linha, consultado a 20 de Agosto de 2012]. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378112708006166>
- > Bertand B., Collaert J.P., Petiot E. (2008). Cómo preparar bien los extractos. *In* Plantas para curar plantas, Ed. La Fertilidad de la Tierra. ISBN: 974-84-932779-9-4. pp. 26-36.
- > Bidarra da Fonseca L.M. (2008). The use of monoclonal and molecular techniques for the identification and qualification of the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. Coimbra: Universidade de Coimbra, Departamento de Zoologia da Faculdade de Ciências e Tecnologia. Tese de doutoramento.
- > Bird D.Mc.K, Williamson V. M., Abad P., McCarter J., Danchin E.G.J. (2009) The genome of root-nematodes, *Ann. Rev. Phytopathol* 47:333-351

- > Bone K., Mill S., Eds. Principle and practices of phytotherapy. *In* Modern Herbal Medicine; Churchill Livingstone: London, U.K. (2000)
- > Broekaert W F., Parijs J. V., Leyns F., Joos H., Peumans W. J. (1989) A Chitin-Binding Lectin from Stinging Nettle Rhizomes with Antifungal Properties. Science. Vol. 245 nº 4922.pp 1100-1102
- > Burt S.A. (2004) Essencial oils:their antibacterial propreties and potencial applicatoinis in food: a Review. International Journal of Food Microbiology 94, 223-253.
- > Chaurasia W., Wichtl M. (1987) Flavonoglykoside aus *Urtica dioica*. Plant Medica 535:423-432.
- > Chitwood D. J. (2002). Phytochemical based strategies for nematode control. Annual Review of Phytopathology 40, 221-249
- > Choi I.-H, Shin S.-C., Park I.-K.. (2007). Nematicidal activity of onion (*Allium cepa*) oil and its components against the pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). Nematology, vol. 9(2), 231-235. [em linha, consultado a 20 de Agosto de 2012]. Disponível em: <http://www.ingentaconnect.com/content/b Brill/nemy/2007/00000009/00000002/art00007>
- > Choi I.-H., Park J.-Y., Shin S.-C., Kim J., Park I.-K. (2007). Nematicidal activity of medicinal plants essential oils against the pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*).Appl. Entomol. Zool 42 (3):397-401 [em linha, consultado a 18 de Agosto de 2011]. Disponível em http://www.jstage.jst.go.jp/article/aez/42/3/42_397/_article
- > Chrubasik S., Enderlein W., Bauer R., Grabner W. (1997). Evidence for antirheumatic effectiveness of Herba *Urticae dioica* in acute arthritis: a pilot study. Phytomedicine, 4, 105-108
- > Clara A. - Doença que afeta pinhal mata “a árvores mais rentável da floresta portuguesa”. Café Portugal-prazeres de viagem e de passeio. (29 de setembro de 2011). [em linha, consultado a 3 de maio de 2014]. Disponível em: http://www.cafeportugal.net/pages/noticias_artigo.aspx?id=4016
- > Coimbra J.L., Soares A.C.F., Garrido M.S., Sousa C.S., Ribeiro F.L.B. (2006). Toxicity of plants extracts to *Scutellonema bradys*. Pesq.Agropec.bras., Brasília, v.41, nº7, pp.1209-1211. [em linha, consultado em 26 de Junho de 2012]. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/pab/v41n7/31205.pdf>

- > Commission Decision 2008/684/EC. Official Journal of the European Union.(17de Agosto de 2008)
- > Coyne D.L., Nicol J.M., Claudius-Cole B. (2007). Nematologia prática: Um guia de campo e de laboratório. SP-IPM Secretariat, Internacional Institute of Tropical Agriculture (IITA), Cotonou, Benin. ISBN: 978-131-337-4 [em linha, consultado 8 de Setembro de 2012] Disponível em: http://www.spipm.cgiar.org/c/document_library/get_file?p_l_id=17829&folderId=18466&name=DLFE-80.pdf
- > DECRETO-LEI nº95/2011.D.R.I Série.nº151 (11-08-08).p.4202
- > Delitheos A., Tiligada A., Yannitsaros A., Bazos I. (1997). Antiphage activity in extracts of plants growing in Greece. Phytomedicine vol.4(2),pp. 117-124 [em linha, consultado em 27 de Setembro de 2012] Disponível em: [http://www.phytomedicinejournal.com/article/S0944-7113\(97\)80055-4/abstract](http://www.phytomedicinejournal.com/article/S0944-7113(97)80055-4/abstract)
- > Dias C.R., Schwan A.V., Ezequiel D.P., Sarmiento M.C., Ferraz S. (2000).Efeito de extratos aquosos de plantas medicinais na sobrevivência de juvenis de *Meloidogyne incognita*. Nematologia Brasileira, vol.24 (2):203-210 [em linha, consultado a 14 de Setembro de 2012] Disponível em: <http://docentes.esalq.usp.br/sbn/nbonline/ol%20242/203-210%20pb.pdf>
- > Direção Regional de Florestas e Conservação da Natureza (DRFCN). Plano de Ação para o controlo do nemátode-da-madeira-do-pinheiro (NMP) na RAM (s.d.). [em linha, consultado a 1 de maio de 2013]. Disponível em: http://www.sra.pt/dr/f/index.php?option=com_content&view=article&id=353%3Aplano-de-acao-para-o-controlo-do-nematodo-da-madeira-de-pinheiro-nmp-na-ram&catid=50%3Aproteccao-da-floresta&Itemid=93&lang=pt
- > DRAPC (2007) Sustentabilidade do Património Natural. Programa de desenvolvimento rural da região centro. Direção Regional de Agricultura e Pescas do Centro, pp. 2-8.
- > Elbadri G.A.A., Lee D.W., Park J.C., Yu H. B., Choo H. Y., Lee S. M., Lim T. H. (2008). Nematocidal Screening of Essential Oils and Extracts against *Bursaphelenchus xylophilus*. Plant Pathology Journal, 24 (2):178-182 European and Mediterranean Plants Protection Organization (EPPO). Date Sheets on Quarentine Pests (s.d.) [em linha, consultado a 19 de Agosto

de 2011]. Disponível em http://www.eppo.org/QUARENTINE/insects/Diaphorina_citri/DIAACI_ds.pdf

- > Faria J. Barbosa P., Mota M., Sanches J., Figueiredo A.C. (2011). Nematicidal activity of essential oil-bearing plants, from Portuguese flora, against the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* in XLII ONTA Annual Meeting-Abstract book, pp.160-162
- > Ferreira J. (2012a) Conceitos, princípios, fundamentos e práticas *in*: As Bases da Agricultura Biológica-Tomo I- Produção Vegetal. EdiBio Edições. pp. 10-14.
- > Ferreira J. (2012b) Práticas Complementares de Proteção- Produtos Fitofarmacêuticos Autorizados *in*: As Bases da Agricultura Biológica-Tomo I- Produção Vegetal. EdiBio Edições. pp. 442-471.
- > Ferreira J. C., Strecht A., Ribeiro J. R., Soeiro A., Cotrim G. (2008) Manual de Agricultura Biológica – fertilização e proteção das plantas para uma agricultura sustentável. 1ª Edição. Agrobio – Associação Portuguesa de Agricultura Biológica, ISBN: 972-97853-0-9. p. 329
- > Ferris H., Zheng L. (1999). Plants sources of Chinese herbal remedies: Effects on *Pratylenchus vulnus* and *Meloidogyne javanica*. Journal of Nematology 31(3):241-263 [em linha, consultado a 10 de Setembro de 2012]. Disponível em: <http://plpnemweb.ucdavis.edu/nemaplex/ferrispublications/pdf%20files/120Ferris-Zheng1999.pdf>
- > Gaofu Q., Shiqing M., Fayin Z., Zhiniu Y., Xiuyun Z. (2007). *In vitro* assesement of plant lectins with anti-pinewood nematode activity. Journal of Invertebrate Pathology 98 (2008) 40-45.[em linha, consultado a 27 de setembro 2012] Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002220110700242X>
- > Garrido J. (2005). Biopeticidas ou agentes de controlo biológico. *In*: Protecção das culturas. Novas perspectivas/Novas realidades. Agro-Manual- Publicações, Lda., ISBN:972-99337-0-7. pp.56-62
- > Gerbe V.- A Horta Biológica. Publicações Europa-América (2009). ISBN: 978-972-1-05987-0. p.63
- > Giblin-Davis R. M. (2003). Interactions of nematodes with insects. *in*: Nematode Interactions. Edited by M. Wajid Khan. CHAPMAN & HALL, pp.302-321

- > Hedin P. A., Hollingworth R.M..(1997) New applications for pest-control agentes. In Phytochemical for Pest Control (P.A. Hedin, E. P. Masler, J. Miyamoto and D.G. Thompson eds). ACS Symposium Series 658, American Chemical Society, Washington, DC, pp,1-12
- > Herbalistes sans Frontières. Nettle (*Urtica dioica*). [em linha, consultado em 15 de maio de 2013] Disponível em: <http://www.hsf-network.com/en/plants-page/nettle-urtica-dioica/>
- > Ibrahim S.K., Traboulsi A.F., El-Haj S. (2006) Effect of essencial oils and plant extracts on hatching, migration and mortality of *Meloidogyne incognita*. Phytopathol. Mediterr. 45, 238-246
- > Ilies D.C., Tudor I., Radulescu A. (2012). Chemical composition of the essencial oil of *Urtica dioica*. Chemistry of Natural Compounds, vol.48, nº 3 [em linha, consultado a 15de maio de 2013] Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10600-012-0291-4>
- > Isman M.B. (2000) Plant essential oils for pest and disease management. Crop Protection 19, 603-608.
- > Kim J., Seo S.-M., Lee S.-Gi, Shin S.-C., Park I.-K. (2008) Nematicidal activity of plant essencial oils and componentes from Coriander (*Coriandrum sativum*), Oriental Sweetgum (*Liquidambar orientalis*) and Valerian (*Valeriana wallichii*) essencial oils against pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*).Journal of Agricultural and Food Chemistry ,56,7316-7360 [em linha, consultado a 18 de Agosto de 2011] Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18605734>
- > Kong J.O., Lee S.M., Moon Y.S., Lee S.G., Ahn Y.J. (2006) Nematicidal activity of plant essencial oils against *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae). Journal of Asia-Pacific Entomology 9:173-178.
- > Kwan S., Ng T.B. (2010) Lectin: production and pratical applications. Appl. Microbiol. Biotechnol 89:45-55. [em linha, consultado a 27 de setembro de 2012] Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3016214/>
- > Langenheim J.H. (1994) Higher plant terpenoids : a phytocentric overview of their ecological roles. J. Chem. Ecol. 20, 1223-1280.
- > Liu F., Yang Z., Zheng X., Luo S., Zhang K., Li G. (2011). Nematicidal coumarin from *Ficus carica* L. Journal of Asia-Pacific Entomology 14 (2011) 79-81 [em

- linha, consultado a 18 de Agosto de 2011] Disponível em:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1226861510001123>
- > Marino R.H., Gomes L.A.A., Cruz E.M.O., Silva A.C., Bianchini F.G., Meneses T.N., Santos H.R., Blank A.F. (2012) Controlo de *Meloidogyne incognita* raça 1 com óleo essencial de *Lippia alba*. Scientia Plena vol.8,nº4 [em linha, consultado 18 de Novembro de 2012] Disponível em:
<http://www.scientiaplena.org.br/ojs/index.php/sp/article/viewFile/832/448>
 - > Metge K. & Burgermeister W. (2005)- Molecular identification and pathway analysis of the introduced pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* in Proc. Symp. Plant Protection and Plant Health in Europe. Introduction and Spread of Invasive Species. p.2
 - > Mota M., Vieira P. (2008). Pine wilt disease: a worldwide threat to forest ecosystems, Heidelberg, Germany Springer
 - > Nemátode da Madeira do Pinheiro. Associação Nacional de Empresas Florestais e Agrícolas e do Ambiente (outubro/novembro/dezembro 2008), pp.3-6
 - > Nemátode-da-madeira-do-pinheiro- Procedimentos legais associados ao decreto-lei nº95/2011, de 8 de agosto. Associação Nacional de Empresas Florestais e Agrícola e do Ambiente (janeiro/fevereiro/março 2012), p.4
 - > Neves W. S., Freitas L. G., Coutinho M. M., Dallemole-iaretta R., Fabry C. F. S., Dhingra O. D., Ferraz S. (2005). Ação nematocida de extratos de alho, mostarda, pimenta malagueta, de óleo de mostarda e de dois produtos à base de capsainóides e alil isotiocianato sobre juvenis de *Meloidigyne javanica*, (treub) Chitwood, 1949, em casa de vegetação. Summa Phytopathol., Botucatu, v.35, n.4, p.255-261 [em linha, consultado a 24 de Abril de 2012]. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-54052009000400001&script=sci_arttext
 - > Noling J.W., Becker J.O. (1994) The challenge of research and extension to define and implement alternatives to methyl bromide. Journal. Nematology. 26:573-586
 - > Oka Y., Nacar S., Putievsky E., Ravid U., Yaniv Z., Spiegel Y. (2000). Nematicidal Activity of Essential Oils and Their Components Against the Root-Knot Nematode. Phytopathology vol.90, nº7 [em linha, consultado a 11 de Setembro de 2012]. Disponível em: <http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO.2000.90.7.710>

- > Pandey R., Kalra A., Tandon S., Mehrotra N., Singh H.N., Kumar S. (2000) Essential oils as potente source of nematocidal compounds, J. Phytopathol. 148, 501-502.
- > Park I.-K., Park J.-Y., Kim K.-H., Choi K.-S., Choi I.-H., Kim C.-S., Shin S.-C.. (2005). Nematicidal activity of plant essencial oils and componentes from garlic (*Allium sativum*) and cinnamon (*Cinnamomum verum*) oil against the pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). Nematology, vol.7(5),767-774 [em linha, consultado a 10 de julho de 2012]. Disponível em: <http://www.ingentaconnect.com/content/brill/nem/2005/00000007/00000005/art00013>
- > Park I.K., Shin S. C. (2005) Fumigant activity of plant essencial oils and components from garlic (*Allium sativum*) and clove bud (*Eugenia caryophyllata*) oils against the Japanese termite (*Reticulitermes spertus* Kolbe). Journal Agricultural and Food Chemistry 53: 4388-4392
- > Park, I.-K, Kim J., Lee S.-G., Shin S.-C. (2007). Nematicidal activity of plant essencial oils and components from Ajowan (*Trachyspermum ammi*), Allspice (*Pimenta dioica*) and Litsea (*Litsea cubeba*) essential oil against Pine Wood Nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*). Journal of Nematology 39(3): 275-279. [em linha, consultado a 11 de julho de 2012]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2586506/>
- > Penelli P., Ieri F., Vignolini P., Bacci L., Baronti S., Romani, A. (2008) Extraction and HPLC Analysis of Phenolic Compounds in Leaves, Stalks, and Textile Fibres of *Urtica dioica* L.. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56,9127-9132.[em linha, consultado a 25 de setembro de 2012] Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18778029>.
- > Pinto I.- Nemátode põe em risco 10 mil postos de trabalho. Diário de Noticias-DN bolsa. (5 de outubro de 2010), p.9
- > Portaria nº103/2006.D.R.I Série. nº 26 (6 de Fevereiro de 2006)
- > Portaria nº553/B/2008.D.R.I Série, nº 123 (27 de Junho 2008)
- > Portaria nº815/2006.D.R.I Série. nº 157 (16 de Agosto de 2006)
- > Quarles W. (1992) Botanical pesticides from Chenopodium. IPM Practitioner, Volume 14, pp 1-11

- > Reganault—Roger C., Philogène B.J.R., Vicent C. (2003) Les biopesticides aujourd'hui: un facteur incontournable de la lute intégrée. *in*: Biopesticides d'origine végétale, Ed. TEC&DOC, pp.11.
- > Regnault-Roger C. (1997) The potencial of botanical essential oils for insect pest control. *Integrated Pest Management Reviews* 2, 25-34.
- > Revista Anefa nº15, pp.4 a 6.
- > Robertson L., Cobacho Arcos S., Escuer M., Santiago Merinos R., Esparrago G., Abelleira A. (2011) Incidence of the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* Steiner & Buhrer, 1934 (Nickle, 1970) in Spain. *Nematology*, 13(6), 755-757.
- > Ryss A.Y., Vieira P., Mota M. (2008) The History of Expansion of the Genus *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchida: Parasitaphelenchidae). *Doklady Biological Sciences*, 419: 97-99.
- > Salgado S.I.M., Campos V.P., Cardos M.D.G., Salgado A.P.S. (2003) Hatching and mortality of second-stage juveniles of *Meloidogyne exigua* in essential plant oils. *Nematol. Brasil.* 27, 17-22.
- > Sangwan N. K., Verma B. S., Verma K.K., Dhindsa K. S. (1990). Nematicidal activity of some essential plants oils. *Pesticides Science.* 28:331-335
- > Silva J. S., Mendes A. C., Oliveira A. C., Fabião A., Correia A.V., Aguiar C., Capelo J. & Catry F. (2007) Pinhais e Eucaliptais. A floresta cultivada, Árvores e Florestas de Portugal Fundação Luso-Americana. Público e Liga para a protecção da natureza, Lisboa.
- > Sousa E., Naves P., Bonifácio L., Inácio L. (2011) Boas práticas fitossanitárias em pinhal. Centro Pinus – Associação para a valorização da floresta de pinho. P. 1-10.
- > Takai K., Suzuki T., Kawazu K. (2003). Development and preventive effect against pine wilt disease of a novel liquid formulation of emamectin benzoate, *Pest Management Scienc*, 59: 365-370
- > *Urtica dioica*; *Urtica urens* (Nettle)- *Alternative Medicine Review*, Volume 12, nº3 (2007). [em linha, consultado a 27 de setembro 2012]. Disponível em: <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma06/pdfs/ortiga01.pdf>.

- > Vasconcelos T., Inácio L. & Bonifácio L. (2008) Pragas e doenças dos pinheiros *in*: Branco M., Valente C. & Paiva M.R. Pragas e doenças em Pinhal e Eucaliptal. Desafios para a sua gestão integrada, ISA Press, Lisboa, p. 18 - 36.
- > Vicente C., Espada M., Vieira P., Mota M. (2012) Pine wilt disease: a threat to European forestry. European Journal Plant Pathology, 133:89-99.
- > Whitehead A.G.-Plant Nematode Control. New York: CAB Internacional, (1998). ISBN 085 199 188 2.pp 23-25
- > Workshop sobre Nemátode da Madeira do Pinheiro. Associação Nacional de Empresas Florestais e Agrícola e do Ambiente nº17 (Julho/Agosto/Setembro 2012), p.10
- > Zar J.H. (1996) Biostatistical analysis, *in*: Prentice Hall Internacional (Ed.). New Jersey USA. p.662

Anexo I

Obtenção e manutenção das culturas de *Bursaphelenchus xylophilus* e *Botrytis cinerea*

Cultura de *Bursaphelenchus* spp.

Meio de cultura de *Botrytis cinerea*

Para 1000mL de meio:

Malt extract	30g
Glycerol	100mL
Agar, granulated	15.7g
Ampicillin (100mg/mL)	1mL

- Dissolver, agitando, o malte e o glycerol em água destilada;
- Adicionar água destilada até 1000mL;
- Adicionar o agar, fechar o frasco e autoclavar (120°C, 20min);
- Deixar arrefecer até cerca de 50°C;
- Pipetar a solução de ampicilina;
- Verter o meio para caixas de Petri de plástico de 9cm de diâmetro e esterilizadas, até cerca de metade da sua altura;
- Deixar arrefecer e solidificar o meio;

Nota: Preparação da ampicilina 100mg/mL

- Pesar 100mg de ampicilina num tubo eppendorff de 1,5 ml;
- Adicionar 1mL de água destilada e dissolver o antibiótico;
- Esterilizar com um filtro de poro 0,2 µm e conservar em tubos de eppendorff autoclavados a -20°C.

Repicagem das culturas de *Botrytis cinerea*

- Com inoculadores de bactérias, retirar pequenos rolos de micélio (branco) do fungo para o centro de caixas com meio de cultura;
- Selar as caixas contendo novas culturas com parafilm;
- Conservar numa caixa de vidro à temperatura ambiente (para cultura de nemátode) ou a 15-17°C (para reserva)

Repicagem da cultura de *Bursaphelenchus*

- Quando as colónias de fungo ocuparem cerca de $\frac{3}{4}$ do meio disponível (cerca de 5 dias após a repicagem)

- Quando os nematodes tiverem consumido quase todo o fungo disponível.
- Com um inoculador de bactérias, retirar um pouco da superfície da cultura a repicar;
- Voltar o inoculador e colocar, ao contrário, o pedaço retirado em cima da cultura do fungo numa caixa nova;
- Selar as caixas novas com parafilm;
- Conservar a temperatura ambiente, numa caixa de vidro.

Extração de nematodes

Quando os nematodes tiverem consumido quase todo o fungo disponível

- Recolher os nematodes que se encontrarem na tampa da caixa de Petri com um esguicho de água destilada;
- Conservá-los numa caixa de Petri de 3cm de diâmetro em água destilada a 4°C (até 3 semanas).

PROTOCOLO GENTILMENTE CEDIDO PELO LABORATÓRIO DE NEMATOLOGIA
DO DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS E
TECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA.

Anexo II

Resultados para cada extrato aplicado no nemátode-da-madeira-do-pinheiro

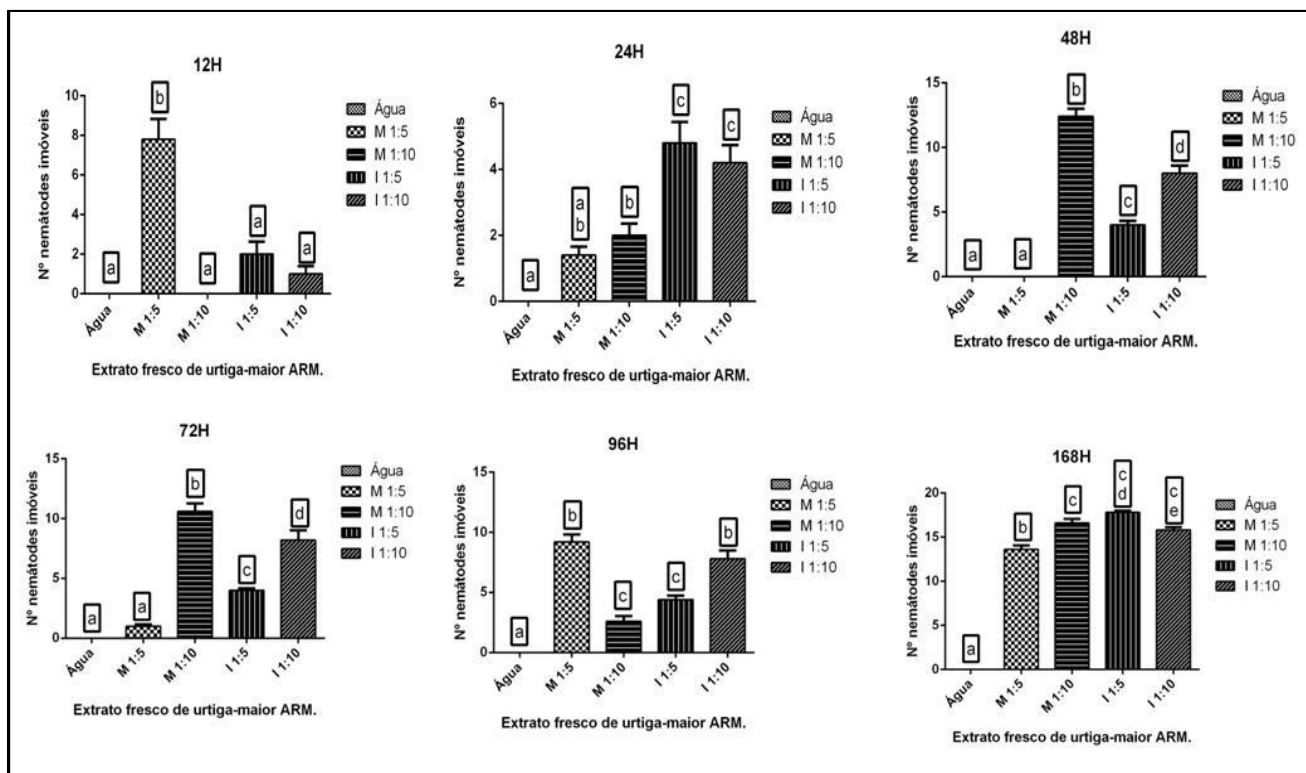


Figura 22- Efeito do extrato fresco de urtiga-maior armazenado sobre *Bursaphelenchus xylophilus*

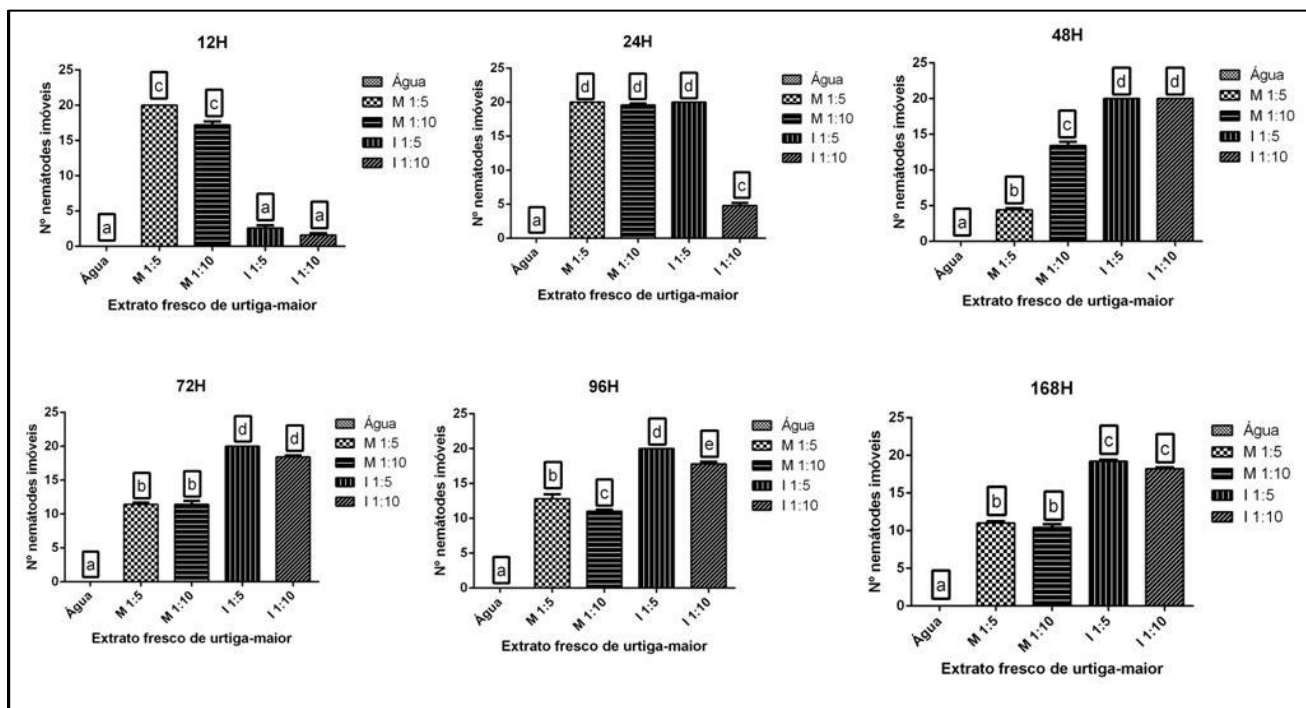


Figura 23-Efeito do extrato fresco de urtiga-maior sobre *Bursaphelenchus xylophilus*

Efeito nematodocida da urtiga-maior e da urtiga-menor sobre o nemátode-da-madeira-do-pinheiro (*Bursaphelenchus xylophilus*)

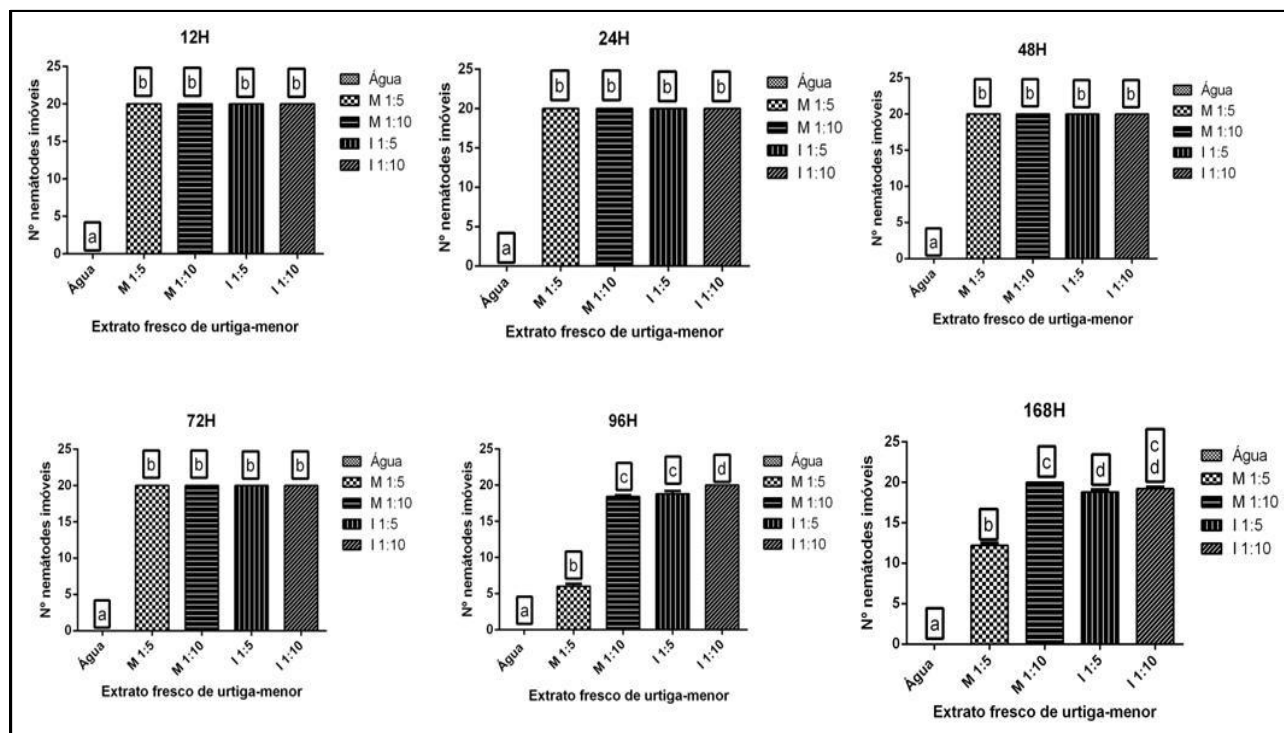


Figura 24- Efeito do extrato fresco de urtiga-menor sobre *Bursaphelenchus xylophilus*

Tabela 2- Percentagem de nemátodes imóveis (%Imb) e percentagem de mortalidade dos diferentes extratos ao longo do tempo de exposição

Extratos	Tempo de exposição (horas)											
	12		24		48		72		96		168	
	%Imb	%Mt	%Imb	%Mt	%Imb	%Mt	%Imb	%Mt	%Imb	%Mt	%Imb	%Mt
1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2	39,0	0,0	7,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	46,0	0,0	68,0	0,0
3	0,0	0,5	10,0	0,5	62,0	0,5	53,0	0,5	13,0	0,5	83,0	0,5
4	10,0	0,0	24,0	0,0	20,0	0,0	20,0	0,0	22,0	0,0	89,0	0,0
5	5,0	0,3	21,0	0,3	40,0	0,3	41,0	0,3	39,0	0,3	79,0	0,3
6	100,0	1,0	100,0	1,0	22,0	1,0	57,0	1,0	64,0	1,0	55,0	1,0
7	86,0	0,5	98,0	0,5	67,0	0,5	57,0	0,5	55,0	0,5	52,0	0,5
8	13,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	96,0	0,0
9	8,0	0,0	24,0	0,0	100,0	0,0	92,0	0,0	89,0	0,0	91,0	0,0
10	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	30,0	0,0	61,0	0,0
11	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	92,0	0,0	100,0	0,0
12	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	94,0	0,0	94,0	0,0
13	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0	0,0	96,0	0,0

Extratos: 1- água; 2-Extrato fresco de urtiga-maior ARM. (M1:5); 3-Extrato fresco de urtiga-maior ARM.(M1:10); 4-Extrato fresco de urtiga-maior ARM. (I 1:5);5- Extrato fresco de urtiga-maior ARM. (I1:10);6- Extrato fresco de urtiga-maior (M1:5); 7-Extrato fresco de urtiga-maior (M1:10); 8-Extrato fresco de urtiga-maior (I1:5); 9-Extrato fresco de urtiga-maior (I1:10); 10- Extrato fresco de urtiga-menor (M1:5); 11-Extrato fresco de urtiga-menor (M1:10), 12- Extrato fresco de urtiga-menor (I1:5); 13- Extrato fresco de urtiga-menor (I1:10)